GeneXpert®
Powered By CEPHEID INNOVATION

Xpert® MRSA/SA SSTI

REF GXMRSA/SA-SSTI-CE

Cepheid

In Vitro Diagnostic Medical Device IVD

CE

301-0190 Rev. C, February 2012

Copyright 2012 © Cepheid. Cepheid®, the Cepheid logo, GeneXpert®, and Xpert® are trademarks of Cepheid.

This product is licensed under US Patent Nos. 5,582,989 and 5,851,767 and corresponding claims of any non-US counterpart(s) thereof.

This product is sold under license from bioMérieux under US Patent No. 6,156,507 and corresponding claims of any non-US counterpart(s) thereof.

The purchase of this product includes a limited, non-transferable license under U.S. Patents Nos. 6,787,338; 6,503,720 and 6,303,305, and claims 9, 10, 11, 56, 76, 80 and 107 of U.S. Patent No. 6,174,670, and corresponding claims in patents and patent applications outside the United States, owned by the University of Utah Research Foundation and licensed to Idaho Technology, Inc., to use only this amount of product and only in an instrument marketed, distributed, sold, leased or otherwise transferred using a Cepheid trademark. No right is conveyed, expressly, by implication or estoppel, under any other patent or patent claims owned by the University of Utah Research Foundation or Idaho Technology, Inc. Without limiting the foregoing, no right, title or license is herein granted with respect to the uses that are proprietary to Idaho Technology or the University of Utah Research Foundation of fluorescence double stranded nucleic acid binding dyes, specifically including but not limited to SYBR® Green I, LCGreen® I, or LCGreen® Plus.

The purchase of this product includes a limited, non-transferable license under U.S. Patent No. 7,449,289, owned by GeneOhm Sciences Canada, Inc (a subsidiary of Becton, Dickinson and Company), to use such product for human IVD use with a GeneXpert® instrument. No right under U.S. Patent No. 7,449,289 is conveyed, expressly, by implication, or by estoppel, to use this product for any other purpose.

NO OTHER RIGHTS ARE CONVEYED EXPRESSLY, BY IMPLICATION OR BY ESTOPPEL TO ANY OTHER PATENTS. FURTHERMORE, NO RIGHTS FOR RESALE ARE CONFERRED WITH THE PURCHASE OF THIS PRODUCT.

Cepheid AB
Röntgenvägen 5
SE-171 54 Solna
Sweden

English

For *In Vitro* Diagnostic Use Only

Proprietary Name

Xpert® MRSA/SA SSTI

Common or Usual Name

MRSA/SA SSTI Assay

Intended Use

The Cepheid Xpert MRSA/SA Skin and Soft Tissue Infection Assay (Xpert MRSA/SA SSTI Assay) performed in the GeneXpert® Dx System is a qualitative *in vitro* diagnostic test intended for the detection of *Staphylococcus aureus* (SA) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from skin and soft tissue infection swabs. The test utilizes automated real-time polymerase chain reaction (PCR) to detect MRSA/SA DNA. The Xpert MRSA/SA SSTI Assay is indicated for use in conjunction with other laboratory tests such as microbiology culture, and clinical data available to the clinician as an aid in the detection of MRSA/SA from skin and soft tissue infections. The Xpert MRSA/SA SSTI Assay is not intended to monitor treatment for MRSA/SA infections. Concomitant cultures for SA and MRSA are necessary to recover organisms for susceptibility testing or epidemiological typing.

Summary and Explanation

Staphylococcus aureus (SA) is a well documented human opportunistic pathogen and a major nosocomial pathogen that causes a range of diseases. Some of the diseases involve the skin and soft tissue infections, including carbuncles and boils, and postoperative wound infections of various sites. As a nosocomial pathogen, *S. aureus* has been a major cause of morbidity and mortality. *S. aureus* infections are often acute and pyogenic and, if untreated, may spread to surrounding tissue or via bacteremia to metastatic sites (involving other organs). Some of the more serious infections produced by *S. aureus* are bacteremia, pneumonia, osteomyelitis, acute endocarditis, toxic shock syndrome, food poisoning, myocarditis, pericarditis, cerebritis, meningitis, chorioamnionitis, scalded skin syndrome, and abscesses of the muscle, urogenital tract, central nervous system, and various intra-abdominal organs[1].

In the early 1950s, acquisition and spread of beta-lactamase-producing plasmids thwarted the effectiveness of penicillin for treating *S. aureus* infections. In 1959, methicillin, a synthetic penicillin, was introduced. However, by 1960, methicillin-resistant *S. aureus* strains were identified. This was determined to be the result of *S. aureus* acquiring the *mecA* gene. In the U.S. today, MRSA is responsible for approximately 25% of nosocomial infections and reports of community-acquired MRSA are increasing, resulting in significant morbidity and mortality. Attributable mortalities of 33% and 16% have been reported for MRSA and methicillin-sensitive *S. aureus* (SA) bacteremias, respectively. There are also rising cost concerns for MRSA infections. In attempts to limit the spread of these infections, control strategies and policies are being developed and implemented in healthcare settings. Controlling MRSA is a primary focus of most hospital infection control programs. Currently, the standard method for detecting MRSA and SA is culture, which is very laborious and can require several days to generate a definitive result.[2,3,4,5,6,7]

Principle of the Procedure

The GeneXpert Dx System automates and integrates sample purification, nucleic acid amplification, and detection of the target sequence in simple or complex samples using real-time PCR assays. The system consists of an instrument, personal computer, and preloaded software for running tests and viewing the results. The system requires the use of single-use disposable cartridges that hold the PCR reagents and host the PCR process. Because the cartridges are self-contained, cross-contamination between samples is minimized. For a full description of the system, see the *GeneXpert Dx System Operator Manual*.

The Xpert MRSA/SA SSTI Assay includes reagents for the detection of MRSA and SA as well as a sample processing control (SPC) to control for adequate processing of the target bacteria and to monitor the presence of inhibitor(s) in the PCR reaction. The SPC also ensures the PCR reaction conditions (temperature and time) are appropriate for the amplification reaction and that the PCR reagents are functional. The Probe Check Control (PCC) verifies reagent rehydration, PCR tube filling in the cartridge, probe integrity, and dye stability.

The primers and probes in the Xpert MRSA/SA SSTI Assay detect proprietary sequences for the staphylococcal protein A (*spa*), the gene for methicillin resistance (*mecA*), and the staphylococcal cassette chromosome (SCC*mec*) inserted into the SA chromosomal *attB* site.

Reagents and Instruments

Material Provided

The Xpert MRSA/SA SSTI Assay kit contains sufficient reagents to process 10 specimens or quality control samples. The kit contains the following:

Xpert MRSA/SA SSTI Assay Cartridges with integrated reaction tubes	**10**
Bead 1, Bead 2, and Bead 3 (freeze-dried)	**1 per cartridge**
Xpert MRSA/SA SSTI Assay Reagent 1	**2.8 ml per cartridge**
Xpert MRSA/SA SSTI Assay Reagent 2 (Sodium Hydroxide)	**3.2 ml per cartridge**
Xpert MRSA/SA SSTI Assay Elution Reagent	**10**
Elution Reagent (Guanidinium thiocyanate)	**1 x 2.0 mL per pouch**
CD	**1 per kit**
Assay Definition File (ADF)	
Instructions to import ADF into GX software	
Package Insert	

Notes:

- Safety Data Sheets (SDS) are available at www.cepheid.com/tests-and-reagents/literature/msds or www.cepheidinternational.com/tests-and-reagents/literature/msds.
- The bovine serum albumin (BSA) in the beads within this product was produced exclusively from bovine plasma sourced in the United States. The manufacturing of the BSA is also performed in the United States. No ruminant protein or other animal protein was fed to the animals; the animals passed ante- and post-mortem testing. During processing, there was no commingling of the material with other animal materials.

Storage and Handling

- Store the Xpert MRSA/SA SSTI Assay cartridges and reagents at 2-28 ˚C.
- Do not use reagents or cartridges that have passed the expiration date.
- Do not open a cartridge until you are ready to perform testing.
- Use the cartridge and reagents within 30 minutes after opening the cartridge lid.
- Do not use any reagents that have become cloudy or discolored.

Materials Required but Not Provided

- GeneXpert Dx System (catalog number varies by configuration): GeneXpert instrument, computer, barcode wand reader, and Operator Manual
- Printer (See the *GeneXpert Dx System Operator Manual* for compatibility guidelines)
- Cepheid Sample Collection Device (900-0370) or Copan equivalent
- Vortex mixer
- Disposable transfer pipettes
- Sterile Gauze

Materials Available but Not Provided

KWIK-STIKs™ from MicroBiologics catalog #0158MRSA and catalog #0360SA as external positive controls and #0371MSSE (methicillin-sensitive *Staphylococcus epidermidis*) as external negative control.

Warnings and Precautions

- Treat all biological specimens, including used cartridges, as if capable of transmitting infectious agents. Because it is often impossible to know which might be infectious, all biological specimens should be treated with standard precautions. Guidelines for specimen handling are available from the U.S. Centers for Disease Control and Prevention[8], and the Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards).[9]

  In a mixed culture containing MRSA/SA and other organisms (e.g., Gram negative bacilli, yeast), results can be false negative or variable depending on the concentration of MRSA/SA present, particularly if the concentration of MRSA/SA is close to the LoD of the assay.

- Follow your institution's safety procedures for working with chemicals and handling biological samples.
- The Xpert MRSA/SA SSTI Assay can detect MRSA and/or SA DNA from non-viable organisms. The probability of this occurring increases for patients on antibiotics.
- The Xpert MRSA/SA SSTI Assay does not provide antimicrobial susceptibility testing results. Additional time is required to culture and perform susceptibility testing.
- Do not substitute Xpert MRSA/SA SSTI Assay reagent with other reagents.
- Do not open the Xpert MRSA/SA SSTI Assay cartridge lid except when adding sample and reagent or performing a retest.
- Do not use a cartridge that has been dropped or shaken after you have added the sample and reagent.
- Do not use a cartridge that has a damaged reaction tube.

- Each single-use Xpert MRSA/SA SSTI Assay cartridge is used to process one test. Do not reuse spent cartridges.
- Consult your institution's environmental waste personnel on proper disposal of used cartridges and unused reagents. This material may exhibit characteristics of federal EPA Resource Conservation and Recovery Act (RCRA) hazardous waste requiring specific disposal requirements. Check state and local regulations as they may differ from federal disposal regulations. Institutions outside the USA should check their country hazardous waste disposal requirements.

- Store the Xpert MRSA/SA SSTI Assay kit at 2-28 °C.
- Do not open a cartridge lid until you are ready to perform testing.

- Elution Reagent contains guanidinium thiocyanate (H402, EUH301), which is harmful to aquatic life and contact with acid liberates toxic gas.

- Reagent 2 contains sodium hydroxide (H314), which is corrosive to eyes and skin, requiring eye and skin protection.

Specimen Collection, Transport and Storage

Swab specimens of skin and soft tissue infections can be taken with the Cepheid Sample Collection Device following the user institution's standard procedures. The specimen swabs are placed back in the plastic transport tube (liquid Stuarts medium, Cepheid Sample Collection Device or Copan recommended), stored at room temperature and sent to the GeneXpert testing area for processing within the next day. The remaining untested swab for microbiology culture should be placed in appropriate transport systems and cultured within 4 days. If not sent by the next day, the specimen should be transported on ice. Alternatively, swabs may be stored at 2-8 °C for testing up to 5 days.

Microbiology Culture

For SSTI culturing methods, follow current laboratory standard operating procedures. For culturing, remaining untested swab specimens should be placed in appropriate transport systems and cultured within 4 days.

Procedure

Preparing the Cartridge

Important: Start the test within 15 minutes of adding the reagents to the cartridge.

To add the sample and reagent into the cartridge:

1. Remove the cartridge and reagent from the package.
2. Remove the swab from the transport container.

Note: Use sterile gauze to handle swab to minimize risk of contamination.

3. Insert the swab into the tube containing the elution reagent and break the swab.
4. Close the elution vial lid and vortex at high speed for 10 seconds.
5. Open the cartridge lid. Using a sterile transfer pipette, transfer the entire contents of the elution reagent to the "S" chamber of the Xpert MRSA/SA SSTI Assay cartridge.
6. Close the cartridge lid.

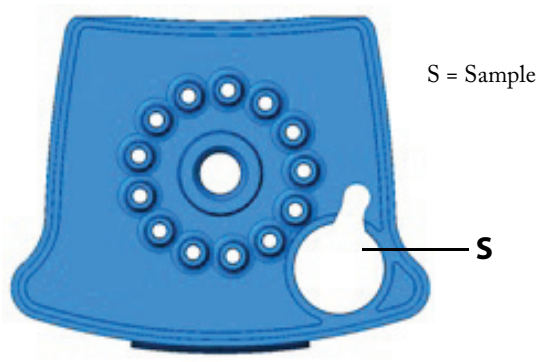

Figure 1. Xpert MRSA/SA SSTI Assay cartridge (top view)

Starting the Test

Important: Before you start the test, make sure the Xpert MRSA/SA SSTI Assay definition file is imported into the software.

This section lists the basic steps for running the test. For detailed instructions, see the *GeneXpert Dx System Operator Manual*.

1. Turn on the GeneXpert Dx instrument and then turn on the computer. The GeneXpert software will launch automatically.
2. Log on to the GeneXpert Dx System software using your user name and password.
3. In the **GeneXpert Dx System** window, click **Create Test**. The **Scan Cartridge Barcode** dialog box appears.
4. Scan the barcode on the Xpert MRSA/SA SSTI Assay cartridge. The **Create Test** window appears. Using the barcode information, the software automatically fills the boxes for the following fields: Select Assay, Reagent Lot ID, Cartridge SN, and Expiration Date.
5. In the **Sample ID** box, scan or type the sample ID. Make sure you type the correct sample ID. The sample ID is associated with the test results and is shown in the **View Results** window and all the reports.
6. Click **Start Test**. In the dialog box that appears, type your password.
7. Open the instrument module door with the blinking green light and load the cartridge.
8. Close the door. The test starts and the green light stops blinking. When the test is finished, the light turns off.
9. Wait until the system releases the door lock before opening the module door and removing the cartridge.
10. The used cartridges should be disposed in the appropriate specimen waste containers according to your institution's standard practices.

Viewing and Printing Results

For detailed instructions on how to view and print the results, see the *GeneXpert Dx System Operator Manual.*

CONTROL

Quality Control

Built-in Quality Controls

Each test includes a Sample Processing Control (SPC or BG3 in the view result screen for the administrative level user) and Probe Check Control (PCC).

- **Sample Processing Control (SPC)** — Ensures the sample was correctly processed. The SPC contains spores of *Bacillus globigii* in the form of a dry spore cake that is included in each cartridge to verify adequate processing of Xpert MRSA/SA SSTI Assay sample. The SPC verifies that lysis of *Staphylococcus aureus* has occurred if the organisms are present and verifies that specimen processing is adequate. Additionally, this control detects specimen-associated inhibition of the real-time PCR assay, ensures the PCR reaction conditions (temperature and time) are appropriate for the amplification reaction, and that the PCR reagents are functional. The SPC should be positive in a negative sample and can be negative or positive in a positive sample. The SPC passes if it meets the validated acceptance criteria.
- **Probe Check Control (PCC)** — Before the start of the PCR reaction, the GeneXpert Dx System measures the fluorescence signal from the probes to monitor bead rehydration, reaction-tube filling, probe integrity, and dye stability. Probe Check passes if it meets the assigned acceptance criteria.

External Controls

- KWIK-STIKs (MicroBioLogics, catalog #0158MRSA [SCC*mec* type II] and catalog #0360SA as positive controls and #0371MSSE as negative control) may be used for training, proficiency testing, and external QC of the GeneXpert Dx System. MRSA strains representing other SCC*mec* types, if available, may be used as additional external positive controls to monitor assay primers and probes not directly controlled in the assay. External controls may be used in accordance with accrediting institutions and government regulations, as applicable. Follow the MicroBioLogics external control procedure described below:
  1. Tear open the pouch at notch and remove the KWIK-STIK.
  2. Pinch the bottom of the ampoule in the cap to release the hydrating fluid.
  3. Hold vertically and tap to facilitate flow of fluid through shaft into bottom of unit containing pellet.
  4. To facilitate dissolution of the lyophilized cell pellet, crush the pellet and gently pinch the bottom chamber.
  5. Pull apart the KWIK-STIK to release the swab, and insert the swab into the tube containing the elution reagent (screw cap).
  6. The KWIK-STIK swab is now ready for Xpert MRSA/SA SSTI Assay testing.
  7. If the External QC fails to perform as expected, repeat external control test and/or contact Cepheid for assistance.

Examples of Xpert MRSA/SA SSTI Assay results are shown in Figure 2 through Figure 5.

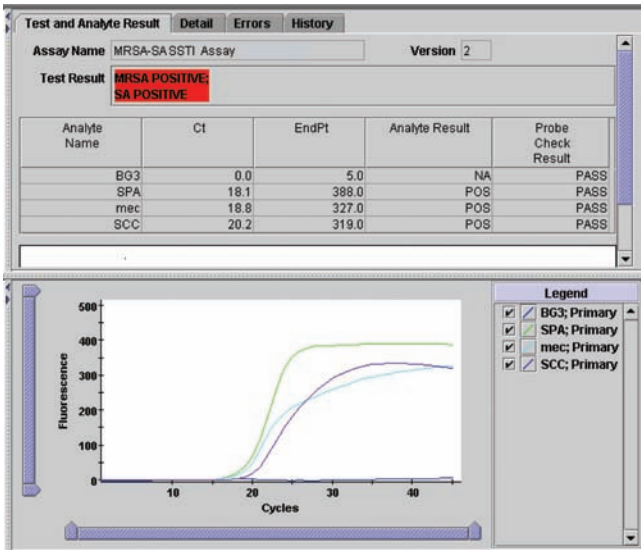
Test and Analyte Result
Detail
Errors
History
Assay Name MRSA-SA SSTI Assay
Version 2
Test Result MRSA POSITIVE; SA POSITIVE
Analyte Name | Ct | EndPt | Analyte Result | Probe Check Result
BG3 | 0.0 | 5.0 | NA | PASS
SPA | 18.1 | 388.0 | POS | PASS
mec | 18.8 | 327.0 | POS | PASS
SCC | 20.2 | 319.0 | POS | PASS
Legend
BG3; Primary
SPA; Primary
mec; Primary
SCC; Primary
Fluorescence
Cycles

Figure 2. An example of a MRSA positive/SA positive result

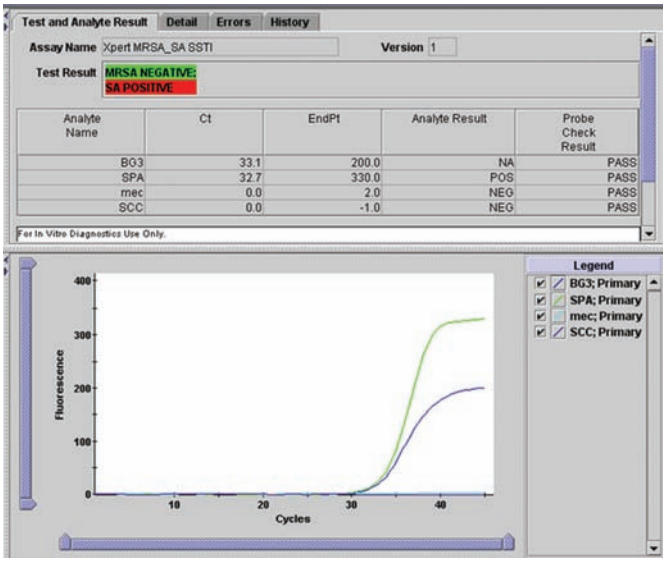
Test and Analyte Result
Detail
Errors
History
Assay Name Xpert MRSA_SA SSTI
Version 1
Test Result MRSA NEGATIVE; SA POSITIVE
Analyte Name | Ct | EndPt | Analyte Result | Probe Check Result
BG3 | 33.1 | 200.0 | NA | PASS
SPA | 32.7 | 330.0 | POS | PASS
mec | 0.0 | 2.0 | NEG | PASS
SCC | 0.0 | -1.0 | NEG | PASS
For In Vitro Diagnostics Use Only.
Legend
BG3; Primary
SPA; Primary
mec; Primary
SCC; Primary
Fluorescence
Cycles

Figure 3. An example of a MRSA negative/SA positive result

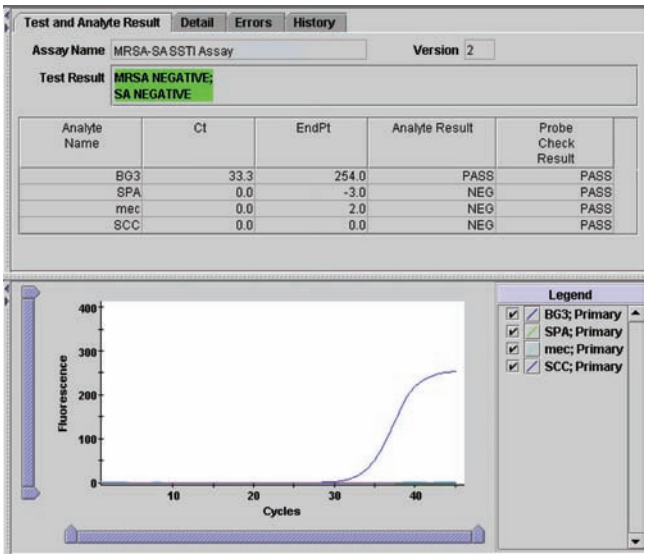

Figure 4. An example of a MRSA negative/SA negative result

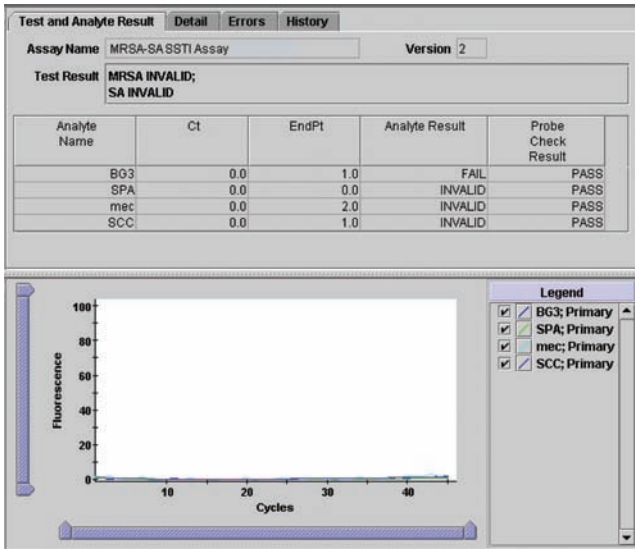

Figure 5. An example of an invalid result

Interpretation of Results

The results are interpolated by the GeneXpert Dx System from measured fluorescent signals and embedded calculation algorithms and will be shown in the **View Results** window. Possible results are:

MRSA POSITIVE/SA POSITIVE
The Xpert MRSA/SA SSTI Assay can detect MRSA and/or SA DNA from non-viable organisms.

MRSA target DNA sequences are detected/SA target DNA sequence is detected.

- MRSA POSITIVE — all MRSA targets (*spa*, *mecA* and SCC*mec*) have a cycle threshold (Ct) within the valid range and endpoint above the minimum setting.
- SPC — NA (not applicable); SPC is ignored because MRSA amplification may compete with this control.
- Probe Check — PASS; all probe check results pass.

MRSA NEGATIVE/SA POSITIVE

The Xpert MRSA/SA SSTI Assay can detect MRSA and/or SA DNA from non-viable organisms.

- MRSA target DNA sequences are not detected/SA target DNA sequence is detected.
- SA POSITIVE — the SA target (*spa*) has a Ct within the valid range and endpoint above the minimum setting. Target DNA for SCC*mec* is not detected, target DNA for *mecA* may or may not be detected, or target DNA for SCC*mec* is detected and target DNA for *mecA* is not detected ("empty cassette").
- SPC — NA (not applicable); SPC is ignored because SA amplification may compete with this control.
- Probe Check — PASS; all probe check results pass.

A Positive test result does not necessarily indicate the presence of viable organisms. It is however, presumptive for the presence of MRSA or SA.

MRSA NEGATIVE/SA NEGATIVE

Staphylococcus aureus target DNA sequence is not detected. SPC meets acceptance criteria.

- NEGATIVE — the *Staphylococcus aureus* target (*spa*) DNA is not detected. Target DNA for *mecA* may or may not be detected, or target DNA for SCC*mec* may or may not be detected.
- SPC — PASS; SPC has a Ct within the valid range and endpoint above the endpoint minimum setting.
- Probe Check — PASS; all probe check results pass.

A False Negative for MRSA (a result of "MRSA NEGATIVE; SA POSITIVE" instead of "MRSA POSITIVE; SA POSITIVE") could be obtained if both MRSA and SA are present in the sample at an MRSA:SA ratio of $1:1x10^6$ or greater.

In the Clinical studies, 5 of the 246 MRSA positive cultures had mixed infections of MRSA and SA. Xpert MRSA/SA SSTI identified 3 of the 5 mixed infections as MRSA positive and 2 of the 5 as SA positive/MRSA negative.

INVALID

Presence or absence of MRSA/SA target DNA sequences cannot be determined, repeat test according to instructions in the section below. SPC does not meet acceptance criteria, the sample was not properly processed, or PCR was inhibited.

- INVALID — Presence or absence of *Staphylococcus aureus* DNA cannot be determined.
- SPC-FAIL — SPC target result is negative and the SPC Ct is not within valid range and endpoint below minimum setting.
- Probe Check — PASS; all probe check results pass.

ERROR

Presence or absence of MRSA/SA target DNA sequences cannot be determined, repeat test according to instructions in the section below. The Probe Check Control failed which is probably due to an improperly filled reaction tube, a probe integrity problem, or because the maximum pressure limits were exceeded.

- MRSA — NO RESULT
- SA — NO RESULT
- SPC — NO RESULT
- Probe Check — FAIL*; one or more of the probe check results fail.

*If the probe check passed, the error is caused by a system component failure.

NO RESULT

Presence or absence of MRSA/SA target DNA sequences cannot be determined, repeat test according to instructions in the section below. Insufficient data were collected to produce a test result. For example, this can occur if the operator stopped a test that was in progress.

- MRSA — NO RESULT
- SA — NO RESULT
- SPC — NO RESULT
- Probe Check — NA (not applicable)

Reasons to Repeat the Assay

Repeat the test using a new cartridge (do not re-use the cartridge) and new reagents. Perform the retest procedure within 3 hours of an indeterminate result.

An INVALID result indicates that the control SPC failed. The sample was not properly processed or PCR was inhibited.

An ERROR result indicates that the Probe Check Control failed and the assay was aborted possibly due to the reaction tube being filled improperly, a reagent probe integrity problem was detected, or because the maximum pressure limits were exceeded.

A NO RESULT indicates that insufficient data were collected. For example, the operator stopped a test that was in progress.

If an External QC fails to perform as expected, repeat external control test and/or contact Cepheid for assistance.

To perform a retest:

If retesting within 3 hours of an indeterminate result*:

1. Transfer remaining contents from Chamber S to a new elution reagent using a disposable transfer pipette.
2. Vortex and add the entire contents of the elution reagent to Chamber S of the new MRSA/SA SSTI Assay cartridge.
3. Close the lid and start new test.

* If the retest can not be performed within 3 hours, use a new sample.

Limitations

The performance of the Xpert MRSA/SA SSTI Assay was validated using the procedures provided in this package insert only. Modifications to these procedures may alter the performance of the test. Results from the Xpert MRSA/SA SSTI Assay should be interpreted in conjunction with other laboratory and clinical data available to the clinician.

The Xpert MRSA/SA SSTI Assay can detect MRSA and/or SA DNA from non-viable organisms. The probability of this occurring increases for patients on antibiotics. In the pivotal clinical study the false positive rate (relative to culture) of detecting SA in patents using antibiotics, within 3 weeks prior to Xpert MRSA/SA testing, was 13.8%. The false positive rate (relative to culture) of detecting MRSA in patients using antibiotics, within 3 weeks prior to Xpert MRSA/SA testing, was 9.5%.

A positive test result does not necessarily indicate the presence of viable organisms. It is however, presumptive for the presence of MRSA or SA.

Testing with the Xpert MRSA/SA SSTI Assay should be used as an adjunct to other methods available.

Erroneous test results might occur from improper specimen collection, failure to follow the recommended sample collection, handling and storage procedures, technical error, sample mix-up, or because the number of organisms in the specimen is too low to be detected by the test. Careful compliance with the instructions in this insert is necessary to avoid erroneous results.

Because the detection of MRSA and SA is dependent on the number of organisms present in the sample, reliable results are dependent on proper specimen collection, handling, and storage.

Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions may affect detection of new or unknown MRSA variants resulting in a false negative result.

In samples containing both MRSA and SA, the Xpert MRSA/SA SSTI Assay may not detect the methicillin-resistant SA organisms. (In the pivotal clinical trial, the Xpert MRSA/SA SSTI Assay failed to detect 2 of 5 MRSA culture positive samples in situations with documented MRSA/SA mixed infections.)

In a mixed culture, the analytical LoD of MRSA is variable when extremely high concentrations of SA are present. Competition from SA was observed at an MRSA:SA ratio of $1:1x10^6$. In the Clinical studies, 5 of the 246 MRSA positive cultures had mixed infections of MRSA and SA. Xpert MRSA/SA SSTI identified 3 of the 5 mixed infections as MRSA positive and 2 of the 5 as SA positive/MRSA negative.

Inhibition of the MRSA/SA SSTI Assay has been observed with the following substances: StaphA $^+$Septic (5% w/v), Hydrocortisone (5% w/v), and antibacterial hand sanitizer (5% w/v).

Samples containing Mercurochrome may not be used due to its fluorescent nature.

The Xpert MRSA/SA SSTI Assay will generate a false positive MRSA result when testing a mixed infection SSTI specimen containing both methicillin-resistant coagulase negative *Staphylococcus* (MRCNS) and empty cassette methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (SA).

Interfering Substances

In the investigational study for Xpert MRSA/SA SSTI Assay, 428 of the 848 specimens were observed to contain blood, and 404 were observed to contain other non-specific substances, which could potentially interfere with the assay (note that some specimens contained more than one type of potential contaminant). Fisher's exact tests conducted on the data generated from swabs with and without these potential interfering substances demonstrated that their presence did not affect the assay performance.

In a non-clinical study, potential interfering substances that may be present in clinical skin and soft tissue infection specimens were evaluated directly relative to the performance of the Xpert MRSA/SA SSTI Assay. Potential interfering substances in skin and soft tissue infections may include, but are not limited to: blood, pus, plasma, topical ointments (antibiotic/antiseptic/pain relieving), debriding agents, and tinctures. These substances are listed in Table 1 and Table 2 with the active ingredients and concentrations tested shown. Inhibition of the MRSA/SA SSTI Assay has been observed with the following substances: StaphA $^{+}$Septic (5% w/v), Hydrocortisone (5% w/v), and antibacterial hand sanitizer (5% w/v).

Samples containing Mercurochrome may not be used due to its fluorescent nature.

Table 1. Potential Interfering SSTI Substances Tested

Substance	Active Ingredient	% Tested
TET Buffer (control)	Control	Control
Buffy Coat (wound surrogate)	WBC (1.5e9/mL)	50% (v/v)
Whole Blood (MRSA/SA free)	N/A	50% (v/v)
Plasma	N/A	50% (v/v)
Neosporin	400 units Bacitracin 5,000 units Polymyxin B 3.5 mg Neomycin	1% and 5% (w/v)
StaphA^{+}Septic	0.2% Benzethonium Chloride, 2.5% Lidocaine HCl	1% and 5% (w/v)
Hydrocortisone	1% Hydrocortisone	1% and 5% (w/v)
Boil-Ease	20% Benzocaine	1% and 5% (w/v)
Iodine Tincture	2% Iodine	50% (v/v)

Table 2. Potential Interfering SSTI Substances Tested

Substance	Active Ingredient	% Tested
TET Buffer (control)	Control	Control
Mupirocin	0.2% Benzethonium Chloride 2.5% Lidocaine HCl	5% (w/v)
Whole Blood (MRSA/SA free)	N/A	50% (v/v)
Saline	0.65% Sodium Chloride	50% (v/v)
Antibacterial hand sanitizer	62% Ethyl alcohol	1% and 5% (w/v)
70% Isopropyl alcohol	70% Isopropyl alcohol	50% (v/v)

Expected Values

In the Xpert MRSA/SA SSTI clinical study, a total of 848 SSTI specimens were included from four large hospitals across the United States. The number and percentage of positive cases by the reference culture method, calculated by age group, are presented in Table 3.

Table 3. Observed Prevalence of MRSA and SA by Culture

Age Group	Total N	MRSA By Culture		SA By Culture	
		Number Positive	Observed Prevalence	Number Positive	Observed Prevalence
Ages Less Than 3	34	11	32.4%	21	61.8%
Ages 3 to 18	100	25	25.0%	55	55.0%
Ages 19 to 65	614	188	30.6%	300	48.9%
Ages 66 and over	100	22	22.0%	35	35.0%

Performance Characteristics

Clinical Performance

Performance characteristics of the Xpert MRSA/SA SSTI Assay were determined in a multi-site prospective investigation study at four US institutions by comparing the Xpert MRSA/SA SSTI Assay with reference culture. Subjects included individuals whose routine care called for collection of a swab from the patient's skin and soft tissue infection for culture.

Double swabs were collected from each subject. One swab was tested by the Xpert MRSA/SA SSTI Assay at the enrolling center and the other swab was tested by the site's standard method, and the remaining specimen was sent to the central laboratory for reference culture testing.

At the centralized laboratory, the specimen was enriched overnight in trypticase soy broth with 6.5% NaCl. The trypticase soy broth was then streaked onto plates with cefoxitin (for MRSA) and without cefoxitin (for SA). If either or both the SA or MRSA plates showed *S. aureus* presumptive colonies, the colonies were subcultured onto a blood agar plate. Confirmation of presumptive positive colonies was performed with catalase, tube coagulase, and Gram stain. *MecA*-Mediated Oxacillin resistance was tested by disk diffusion test using a 30 µg cefoxitin disk and cutoff of 21/22 mm. If the cultures for both the SA and MRSA plates were determined to be negative, the archived trypticase soy broth with 6.5% NaCl was subcultured onto blood agar followed by workup for SA/MRSA as previously described.

Performance of the Xpert MRSA/SA SSTI Assay was calculated relative to the reference culture results.

Overall Results

A total of 848 specimens were tested for MRSA and SA by Xpert MRSA/SA SSTI Assay and culture.

Among the 848 cases in the eligible data set, antibiotic use within the 3 weeks prior to sample collection was reported for 207 subjects, and no antibiotic use was confirmed for 441 subjects; for 200 cases, antibiotic status was unknown. A statistically significant decrease in the positivity rate of SA with respect to culture results was observed when antibiotics were used (p=0.007); this phenomenon has also been reported in the literature.[10, 11, 12, 13, 14] The MRSA positivity rate for culture was also decreased, although to a lesser extent (p=0.022). The decrease in positivity was not observed with the Xpert MRSA/SA SSTI Assay when antibiotics were used nor was any inhibition observed in the assay in the presence of topical antibiotics (see Interfering Substances). The decreased culture positivity rates for MRSA and SA in the presence of antibiotics caused the higher than expected false positive rates observed with the Xpert MRSA/SA SSTI Assay.

Five (5) of the 246 MRSA positive cultures had mixed infections of MRSA and SA. Xpert MRSA/SA SSTI identified 3 of the 5 mixed infections as MRSA positive and 2 of the 5 as SA positive/MRSA negative.

The performance of the Xpert MRSA/SA SSTI Assay is summarized in Table 4 through Table 6.

Table 4. MRSA/SA Performance in Subjects with No Antibiotic Use (within 3 weeks of sample collection) vs. Reference Culture

		Culture			
		MRSA+	**SA+/MRSA-**	**Neg/No Growth**	**Total**
Xpert	MRSA+	137[a]	2	6	145
	SA+/MRSA-	3[b]	79	16	98
	SA-	6	4	188	198
	Total	146	85	210	441

[a] 1 of the 137 was mixed infection of MRSA and SA.
[b] 2 of the 3 were mixed infections of MRSA and SA.

Positive Percent Agreement (MRSA+) = 93.8; 95% Confidence Interval = 88.6-97.1

Negative Percent Agreement (MRSA+) = 97.3; 95% Confidence Interval = 94.7-98.8

Positive Percent Agreement (SA+/MRSA+) = 95.7; 95% Confidence Interval = 92.2-97.9

Negative Percent Agreement (SA+/MRSA+) = 89.5; 95% Confidence Interval = 84.6-93.3

Among subjects with no antibiotic use within the 3 weeks prior to sample collection, the Xpert MRSA/SA SSTI Assay identified 93.8% of the specimens positive for MRSA and 97.3% of the specimens negative for MRSA relative to the reference culture method, and 95.7% of the specimens positive for SA and 89.5% of the specimens negative for SA relative to the reference culture method.

Among these subjects with no antibiotic use, 96.8% (427/441) were successful on the first attempt with the Xpert MRSA/SA SSTI Assay. The remaining 14 gave indeterminate results on the first attempt (6 "INVALID", 7 "ERROR" and 1 "NO RESULT"). Of the 14 indeterminate on the first attempt, all gave a result on the second attempt.

Table 5. MRSA/SA Performance in Subjects with Unknown Antibiotic Use (within 3 weeks of sample collection) vs. Reference Culture

		Culture			
		MRSA+	**SA+/MRSA-**	**Neg/No Growth**	**Total**
Xpert	MRSA+	47[c]	0	4	51
	SA+/MRSA-	2	45	8	55
	SA-	1	2	91	94
	Total	50	47	103	200

[c] 2 of the 47 were mixed infections of MRSA and SA.

Positive Percent Agreement (MRSA+) = 94.0; 95% Confidence Interval = 83.5-98.7

Negative Percent Agreement (MRSA+) = 97.3; 95% Confidence Interval = 93.3-99.3

Positive Percent Agreement (SA+/MRSA+) = 96.9; 95% Confidence Interval = 91.2-99.4

Negative Percent Agreement (SA+/MRSA+) = 88.3; 95% Confidence Interval = 80.5-93.8

When it was unknown if subjects took antibiotics within the 3 weeks prior to sample collection, the Xpert MRSA/SA SSTI Assay identified 94.0% of the specimens positive for MRSA and 97.3% of the specimens negative for MRSA relative to the reference culture method, and 96.9% of the specimens positive for SA and 88.3% of the specimens negative for SA relative to the reference culture method.

Among these subjects with unknown antibiotic use, 97.0% (194/200) were successful on the first attempt with the Xpert MRSA/SA SSTI Assay. The remaining 6 gave indeterminate results on the first attempt (2 "INVALID", 3 "ERROR" and 1 "NO RESULT"). Of the 6 indeterminate on the first attempt, all gave a result on the second attempt.

Table 6. MRSA/SA Performance in Subjects with Known Antibiotic Use (within 3 weeks of sample collection) vs. Reference Culture

		Culture			
		MRSA+	**SA+/MRSA-**	**Neg/No Growth**	**Total**
Xpert	MRSA+	44	2	10	56
	SA+/MRSA-	3	31	19	53
	SA-	3	1	94	98
	Total	50	34	123	207

Positive Percent Agreement (MRSA+) = 88.0; 95% Confidence Interval = 75.7-95.5

Negative Percent Agreement (MRSA+) = 92.4; 95% Confidence Interval = 87.0-96.0

Positive Percent Agreement (SA+/MRSA+) = 95.2; 95% Confidence Interval = 88.3-98.7

Negative Percent Agreement (SA+/MRSA+) = 76.4; 95% Confidence Interval = 67.9-83.6

Among subjects with known antibiotic use within the 3 weeks prior to sample collection, the Xpert MRSA/SA SSTI Assay identified 88.0% of the specimens positive for MRSA and 92.4% of the specimens negative for MRSA relative to the reference culture method, and 95.2% of the specimens positive for SA and 76.4% of the specimens negative for SA relative to the reference culture method.

Among these subjects with antibiotic use, 96.1% (199/207) of these eligible specimens were successful on the first attempt with the Xpert MRSA/SA SSTI Assay. The remaining 8 gave indeterminate results on the first attempt (5 "INVALID" and 3 "ERROR"). Of the 8 indeterminate on the first attempt, all gave a result on the second attempt.

Empty Cassette Variants

For an isolate to be identified as MRSA positive with the Xpert MRSA/SA SSTI Assay, the test for *spa* must be positive as well as the test for *mecA* and SCC*mec*. An isolate that is positive for *spa* and SCC*mec*, but not *mecA* is reported SA because it is methicillin-sensitive. This situation can occur when the portion of the SCC*mec* element carrying *mecA* is excised, but the ends of this mobile element remain in place, yielding a positive SCC*mec* signal. These isolates are sometimes referred to as "empty cassette variants" and are not uncommon in the clinical environment. The significance of these isolates is to potentially confound an assay for MRSA that does not detect the *mecA* gene directly. The Xpert MRSA/SA SSTI Assay was designed to correctly identify these variants as SA.

Among the eligible specimens included in the data analyses presented in this report, a total of 16 isolates fit the empty cassette profile resulting in positive *spa* and SCC*mec* test results, but no *mecA* detection (Ct = 0) as shown in Table 7. Fifteen (15) of the 16 were verified MRSA true negative isolates relative to culture, and 14 of 16 were verified true positive SA isolates relative to culture. One isolate was identified as MRSA by culture and 2 isolates were both MRSA and SA negative by culture.

Table 7. MRSA/SA SSTI Performance vs. Reference Culture — Empty Cassette Variants

	Xpert	spa	mecA	SCC*mec*		Xpert vs. Culture	
Subject #	Result	(Ct)	(Ct)	(Ct)	Culture	MRSA	SA
1	SA	23.6	0	26.0	SA	TN	TP
2	SA	14.7	0	16.5	SA	TN	TP
3	SA	20.5	0	34.0	SA	TN	TP
4	SA	18.4	0	21.0	SA	TN	TP
5	SA	15.6	0	28.4	MRSA	FN	TP
6	SA	17.2	0	31.6	SA	TN	TP
7	SA	34.1	0	35.6	Neg	TN	FP
8	SA	29.1	0	33.0	SA	TN	TP
9	SA	12.7	0	23.5	SA	TN	TP
10	SA	18.2	0	27.6	SA	TN	TP
11	SA	18.4	0	22.0	SA	TN	TP
12	SA	25.5	0	27.7	SA	TN	TP
13	SA	20.0	0	22.1	Neg	TN	FP
14	SA	26.0	0	28.3	SA	TN	TP
15	SA	23.9	0	25.7	SA	TN	TP
16	SA	19.9	0	34.0	SA	TN	TP

Analytical Performance

Analytical Specificity

Cross-reactivity Study

One hundred five (105) strains were collected, quantitated and tested using the Xpert MRSA/SA SSTI Assay. The 98 cultures from the American Type Culture Collection (ATCC) and 7 strains from the Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* (NARSA) represent species phylogenetically related to *Staphylococcus aureus* or those potentially encountered in a hospital environment.

Of these, methicillin-sensitive coagulase negative staphylococci (29) and methicillin-resistant coagulase negative staphylococci (9) were included. The organisms tested were identified as either Gram positive (74), Gram negative (28), or yeast (3). The organisms were further classified as either aerobic (95) or anaerobic (10).

Two (2) or more replicates of each isolate were tested at 1.7-3.2 McFarland units. Under the conditions of the study, all isolates were reported MRSA negative and SA negative; none of the isolates were detected by the Xpert MRSA/SA SSTI Assay. Positive and Negative controls were included in the study. The analytical specificity was 100%.

Evaluation of BORSA Strains

Seven (7) well characterized borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA) strains were tested, including one apparent "empty cassette" (see above). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is resistant to all ß-lactam drugs through the alternative penicillin-binding protein PBP2a encoded by *mecA*[15]. BORSA strains are *mecA* negative, but exhibit an oxacillin minimum inhibitory concentration (MIC) ≥ 2 and ≤ 8 µg/mL. It is especially valuable to distinguish MRSA from BORSA to prevent the unnecessary and inappropriate use of vancomycin and isolation precautions not warranted for patients infected with a ß-lactam susceptible strain[16].

Under the conditions of this study, all 7 BORSA isolates (including the apparent "empty cassette" isolate) were reported MRSA negative/SA positive at both high and low cell concentrations using the Xpert MRSA/SA SSTI Assay. No *mecA* signals were reported. These results demonstrate that a BORSA strain will be correctly identified as MRSA negative/SA positive and will not report a false positive MRSA test result using the Xpert MRSA/SA SSTI Assay.

Analytical Sensitivity

Limit of Detection Studies

Studies were performed to determine the 95% confidence intervals for the analytical limit of detection (LoD) of *Staphylococcus aureus* (SA) cells and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) cells diluted into a surrogate wound matrix of human origin. The surrogate wound matrix consisted of a white blood cell (WBC) concentrate prepared from whole blood by centrifugation. The matrix also contained red blood cells (RBC) and plasma, and a negligible amount of anticoagulant (CPD or CPDA-1). The limit of detection is defined as the lowest number of colony forming units (CFU) per sample that can be reproducibly distinguished from negative samples with 95% confidence or the lowest concentration at which 19 of 20 replicates were positive.

For MRSA, replicates of 20 were evaluated at each MRSA concentration tested (CFU/swab) for 6 individual isolates representing SCC*mec* types I, II, III, IVa, V, and VI. When characterized by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), USA100, the most common healthcare-acquired strain and USA400, one of the most common community-acquired strains were represented.

For SA, replicates of 20 were evaluated at each SA concentration (CFU/swab) for 3 individual SA isolates. USA types USA900 and USA1200 were represented.

The estimate and confidence intervals were determined using logistic regression with data (number of positive results per number of replicates at each level) over the range of CFU/swab tested. The confidence intervals were determined using maximum likelihood estimates on the logistic model parameters using the large sample variance-covariance matrix. The LoD point estimates and 95% upper and lower confidence intervals for each SA and each MRSA SCC*mec* type tested are summarized in Table 8 and Table 9.

Table 8. 95% Confidence Intervals for Analytical LoD – SA

SA Strain ID	PFGE	LoD (CFU/swab)	Lower 95% CI	Upper 95% CI
N7129	USA900	51	42	69
102-04	USA1200	87	76	109
29213	unknown	123	97	188

Table 9. 95% Confidence Intervals for Analytical LoD – MRSA

MRSA Strain ID	SCC*mec* Type	PFGE	LoD (CFU/swab)	Lower 95% CI	Upper 95% CI
64/4176	I	USA500	221	195	271
N315	II	USA100	122	106	152
11373	III	unknown	124	115	155
MW2	IVa	USA400	82	68	113
ST59-MRSA-V	V	USA1000	242	208	305
HDE288	VI	USA800	183	161	223

The results of this study indicate that the Xpert MRSA/SA SSTI Assay will produce a positive SA result 95% of the time with 95% confidence for a wound swab containing 150 CFU and a positive MRSA result 95% of the time with 95% confidence for a wound swab containing 300 CFU.

One hundred twenty-one (121) additional *Staphylococcus aureus* strains were tested using the Xpert MRSA/SA SSTI Assay. Overnight cultures were grown in Brain Heart Infusion (BHI) media and adjusted to 0.5 McFarland units. All strains were tested in triplicate using 100 µL of cultures further diluted 100 thousand to one million-fold.

MRSA (78) and SA (43) strains were selected to broadly represent the range of genetic diversity found in the species *Staphylococcus aureus* based on phylogenetic structure. Selections represent primary lineages with emphasis on specific clonal complexes within which MRSA is predominantly observed. Lineages that contain MRSA and SA, as well as those that contain SA exclusively were included.

The Xpert MRSA/SA SSTI Assay correctly identified 116 of 121 strains. The 5 discordants were characterized by catalase, tube coagulase, and Gram stain. *MecA*-Mediated Oxacillin resistance was assessed by disk diffusion using a 30 µg cefoxitin disk and a diameter cut-off of 21/22 mm.

Three (3) of 78 MRSA strains were reported MRSA negative/SA positive using the Xpert MRSA/SA SSTI Assay. Further characterization indicates these strains are not resistant and were correctly reported MRSA negative; SA positive.

Two (2) of 43 SA strains were reported MRSA positive/SA positive using the Xpert MRSA/SA SSTI Assay. Further characterization indicates these strains are resistant and were correctly reported MRSA positive/SA positive.

Each of the 12 known USA300 isolates were correctly reported MRSA positive and SA positive as expected.

Evaluation of Empty Cassette Variants

Twenty-two (22) *Staphylococcus aureus* isolates identified as "empty cassette variants" were tested using the Xpert MRSA/SA SSTI Assay. Overnight cultures were adjusted to 0.5 McFarland units. All strains were tested from cultures further diluted 100-fold (high) and 100 thousand-fold (low).

The Xpert MRSA/SA SSTI Assay correctly identified all 22 isolates as MRSA negative and SA positive. At both cell concentrations tested, only Cts for the *spa* and SCC*mec* targets were reported. No *mecA* Cts were reported.

Carry-Over Contamination Study

A study was conducted to demonstrate that single-use, self-contained GeneXpert cartridges prevent carry-over contamination in negative samples run following very high positive samples in the same GeneXpert module. The study consisted of a negative sample processed in the same GeneXpert module immediately following a very high MRSA positive sample (roughly 10^7 CFU/test). This was repeated 20 times between 2 GeneXpert modules for a total of 42 runs. There was no evidence of any carry-over contamination. All 21 positive samples were correctly reported MRSA positive/SA positive. All 21 negative samples were correctly reported MRSA negative/SA negative.

Reproducibility

A panel of 10 specimens with varying concentrations of SA, MRSA, and *Staphylococcus epidermidis* (negative) were tested in duplicate on 10 different days at each of the three sites (10 specimens x 2 times/day x 10 days x 3 sites). One lot of Xpert MRSA/SA kit was used at each of the 3 testing sites. Xpert MRSA/SA assays were performed according to the Xpert MRSA/SA SSTI Assay procedure.

Table 10. Summary of Reproducibility Results

Specimen ID	Site 1	Site 2	Site 3	Total Agreement
Neg (MSSE)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
SA High Neg	100% (20/20)	100% (20/20)	90% (18/20)	96.7% (58/60)
SA Low Pos	100% (20/20)	100% (20/20)	95% (19/20)	98.3% (59/60)
MRSA1 High Neg	100% (20/20)	90% (18/20)	100% (20/20)	96.6% (58/60)
MRSA1 Low Pos	100% (20/20)	100% (20/20)	90% (18/20)	96.6% (58/60)
MRSA2 High Neg	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
MRSA2 Low Pos	100% (20/20)	95% (19/20)	95% (19/20)	96.6% (58/60)
% Total Agreement by Site	100% (140/140)	97.9% (137/140)	95.7% (134/140)	97.9% (411/420)

Table 11. Summary of Ct Value Results by Sample Level and Probe

SPC			
Level	**Mean**	**Std Dev**	**%CV**
MRSA1 High Neg	34.52	0.82	2.36
MRSA2 High Neg	34.46	0.85	2.46
Neg (MSSE)	34.44	0.90	2.62
SA High Neg	34.38	0.92	2.66
Spa			
Level	**Mean**	**Std Dev**	**%CV**
MRSA1 Low Pos	32.96	0.8	2.44
MRSA2 Low Pos	31.05	0.69	2.21
SA Low Pos	33.91	0.8	2.35
mecA			
Level	**Mean**	**Std Dev**	**%CV**
MRSA1 Low Pos	33.25	0.80	2.40
MRSA2 Low Pos	31.50	0.68	2.16
SCC*mec*			
Level	**Mean**	**Std Dev**	**%CV**
MRSA1 Low Pos	34.19	0.90	2.63
MRSA2 Low Pos	33.13	0.68	2.05

A second reproducibility study was performed using a panel of 4 specimens of (SA: 10X LoD, MRSA1: 10X LoD, MRSA2: 10X LoD, and Negative Control: *Staphylococcus epidermidis*). The panels were tested in duplicate on 10 different days at each of the three sites (4 specimens x 2 times/day x 10 days x 3 sites). One lot of Xpert MRSA/SA SSTI Assay was used at each of the 3 testing sites. Xpert MRSA/SA SSTI assays were performed according to the Xpert MRSA/SA SSTI Assay procedure. The correct results were obtained in 239 of 240 tests.

Table 12. Summary of Reproducibility Results

Specimen ID	Site 1	Site 2	Site 3	Total Agreement
Neg (MSSE)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
SA Moderate Pos[1]	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
MRSA1 Moderate Pos[1]	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
MRSA2 Moderate Pos[1]	100% (20/20)	100% (20/20)	95% (19/20)	98.3% (59/60)
% Total Agreement by Site	100% (80/80)	100% (80/80)	98.8% (79/80)	99.6% (239/240)

[1] 10X LoD

Table 13. Summary of Ct Value Results by Sample Level and Probe

SPC			
Level	**Mean**	**Std Dev**	**%CV**
MRSA1 Moderate Pos	35.72	1.87	5.24
MRSA2 Moderate Pos	36.29	2.66	7.34
SA Moderate Pos	34.55	1.19	3.44
NEG	34.45	1.06	3.09
Spa			
Level	**Mean**	**Std Dev**	**%CV**
MRSA1 Moderate Pos	29.52	1.30	4.40
MRSA2 Moderate Pos	28.91	1.03	3.57
SA Moderate Pos	30.59	0.91	2.99
mecA			
Level	**Mean**	**Std Dev**	**%CV**
MRSA1 Moderate Pos	29.78	1.28	4.29
MRSA2 Moderate Pos	29.32	1.24	4.22
SCC*mec*			
Level	**Mean**	**Std Dev**	**%CV**
MRSA1 Moderate Pos	31.49	1.26	3.99
MRSA2 Moderate Pos	31.05	1.12	3.59

References

1. Bannerman TL. 2003 Chapter 28: Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci that Grow Aerobically. Manual of clinical microbiology, 8th ed. ASM Press Washington, DC. Pages 384-404.
2. Mainous AG, Hueston WJ, Everett, et al. 2006. Nasal Carriage of Staphylococcus aureus and Methicillin-Resistant S aureus in the United States, 2001-2002. An Family Medicine. 4(2):132-137.
3. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. Am J Infect Control 2004;32:470-85.
4. Chaix C, Durand-Zileski I, Alberti C, Buisson B. 1999. Control of Endemic Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. JAMA 282(19):1745-51.
5. Shopsin B, Kreiswirth BN. 2001. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Emerging Infectious Diseases 7(2) 323-6.
6. Salgado CD et al. 2003. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Meta-analysis of Prevalence and Risk Factors. CID 36:131.
7. Donnio, P-Y, Février F, Bifani P, et al. 2007. Molecular and epidemiological evidence for the spread of multiresistant methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains in hospitals. Antimicrobial. Agents Chemother. 51: 4342 – 4350.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). HHS Publication number (CDC) 93-8395.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (refer to latest edition).
10. Ewig S, Schlochtermeier M, Göke N, et al. 2002. Applying sputum as a diagnostic tool in pneumonia: limited yield, minimal impact on treatment decisions. Chest. 121:1486-1492.
11. RG Dotson and SK Pingleton. 1993. The effect of antibiotic therapy on recovery of intracellular bacteria from bronchoalveolar lavage in suspected ventilator-associated nosocomial pneumonia. Chest. 103, 541-546.
12. Souweine B, Veber B, Bedos JP, et al. 1998. Diagnostic accuracy of protected specimen brush and bronchoalveolar lavage in nosocomial pneumonia: impact of previous antimicrobial treatments. Crit Care Med. Feb;26(2):236-244.
13. Kanegaye JT, Soliemanzadeh P, Bradley JS, et al. 2001. Lumbar puncture in pediatric bacterial meningitis: defining the time interval for recovery of cerebrospinal fluid pathogens after parenteral antibiotic pretreatment. Pediatrics. 108(5):1169-1174.
14. Brook I, Gober A. 2005. Effects of amoxicillin and cefdinir on nasopharyngeal bacterial flora. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. Sep;131:785-787.
15. Nadarajah J, et. al., Identification of different clonal complexes and diverse amino acid substitutions in penicillin-binding protein 2 (PBP2) associated with borderline oxacillin resistance in Canadian *Staphylococcus aureus* isolates. J of Med Micro (2006), 55: 1675-1683.
16. Ribeiro J, et. al., Misclassification of Susceptible Strains of *Staphylococcus aureus* as Methicillin-Resistant *S. aureus* by a rapid Automated Susceptibility Testing System. (1999), 37: 1619-1620.

Assistance

For assistance, contact Cepheid using one of the following contact details. Make sure you provide the instrument serial number and reagent lot ID when you call or email.

European Union

For technical support, use the following contact details:

Tel: +33.563.82.53.19

Email: techsupport@cepheideurope.fr

Other Locations

Contact your local Cepheid representative.

Table of Symbols

Symbol	Meaning
REF	Catalog number
IVD	*In vitro* diagnostic medical device
	Do not reuse
LOT	Batch code
	Caution, consult accompanying documents
	Manufacturer
	Contains sufficient for <n> tests
	Expiration date
CONTROL	Control
EC REP	Authorized representative in the European Community
CE	CE marking – European Conformity
	Temperature limitation
	Biological risks

Cepheid AB
Röntgenvägen 5
SE-171 54 Solna
Sweden

Product of Sweden

EC REP

Cepheid Europe
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

Tel: +33.563.82.53.00
Fax: +33.563.82.53.01
Email: cepheid@cepheideurope.fr

CE IVD

Français

Pour une utilisation de diagnostic *in vitro* uniquement

Nom déposé

Xpert® MRSA/SA SSTI

Nom d'usage

Test MRSA/SA SSTI

Utilisation prévue

Le test Xpert MRSA/SA des infections de la peau et des tissus mous (SSTI, Skin and Soft Tissue Infection) de Cepheid réalisé dans le GeneXpert® Dx System est un test de diagnostic *in vitro* qualitatif conçu pour la détection du *Staphylococcus aureus* (SA) et du *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) sur écouvillon lors d'infections de la peau et des tissus mous. Le test utilise la réaction en chaîne par la polymérase (PCR) en temps réel automatisée pour détecter l'ADN du SARM/SA. Le test Xpert MRSA/SA SSTI est conçu pour être utilisé en association avec d'autres tests de laboratoire, tels que la culture microbiologique, ainsi qu'avec les données cliniques dont dispose le clinicien pour contribuer à la détection du SARM/SA lors d'infections de la peau et des tissus mous. Le test Xpert MRSA/SA SSTI n'est pas indiqué pour contrôler le traitement des infections à SARM/SA. Les cultures simultanées du SA et du SARM servent uniquement à récupérer des organismes pour le typage épidémiologique ou pour des tests de sensibilité.

Résumé et explication

Le *Staphylococcus aureus* (SA) est un agent pathogène opportuniste humain bien connu et un important agent pathogène nosocomial, à l'origine de nombreuses pathologies. Certaines peuvent comporter des infections de la peau et des tissus mous, notamment l'anthrax et des furoncles, ainsi que des infections postopératoires de plaies en différents endroits. En tant qu'agent pathogène nosocomial, le *S. aureus* est une cause majeure de morbidité et de mortalité. Les infections à *S. aureus* sont fréquemment aiguës et pyogènes. En l'absence de traitement, elles peuvent se propager aux tissus environnants ou, par bactériémie, à des foyers métastatiques (impliquant d'autres organes). Les infections plus graves dues au *S. aureus* comprennent la bactériémie, la pneumonie, l'ostéomyélite, l'endocardite aiguë, le syndrome de choc toxique, l'intoxication alimentaire, la myocardite, la péricardite, la cérébrite, la méningite, la chorioamnionite, l'érythrodermie bulleuse avec épidermolyse, ainsi que des abcès des muscles, de l'appareil génito-urinaire, du système nerveux central et de divers organes intra-abdominaux[1].

Au début des années cinquante, le développement de plasmides producteurs de bêta-lactamases a contrecarré l'efficacité de la pénicilline pour le traitement des infections à *S. aureus*. En 1959, l'utilisation de la méthicilline, une pénicilline synthétique, a été adoptée. Vers 1960, des souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline ont toutefois été identifiées. Des études ont montré que ce phénomène résultait de l'acquisition du gène *mecA* par le *S. aureus*. Actuellement, aux États -Unis, le SARM est responsable d'environ 25 % des infections nosocomiales et le nombre de cas de SARM communautaire augmente, provoquant une morbidité et une mortalité importantes. Un taux de mortalité attribuable de 33 % est signalé pour le SARM et de 16 % pour les bactériémies à SASM (*S. aureus* sensible à la méthicilline). Les frais liés aux infections à SARM augmentent également considérablement. Pour tenter de limiter la propagation de ces infections, des stratégies et des politiques de contrôle ont été développées et mises en œuvre dans les établissements de santé. Le contrôle du SARM constitue l'objectif principal de la plupart des programmes de contrôle des infections des hôpitaux. À l'heure actuelle, la méthode standard de détection du SARM et du SA est la mise en culture, qui est très laborieuse et peut prendre plusieurs jours pour l'obtention d'un résultat définitif.[2,3,4,5,6,7]

Principe de la procédure

GeneXpert Dx System automatise et intègre la purification d'échantillons, l'amplification d'acide nucléique et la détection de la séquence cible dans des échantillons simples ou complexes, en utilisant la réaction en chaîne par la polymérase (RT-PCR) en temps réel. Le système est composé d'un appareil, d'un ordinateur personnel et d'un logiciel préchargé pour effectuer des tests et afficher les résultats. Le système requiert l'utilisation de cartouches jetables et à usage unique, qui contiennent les réactifs PCR et abritent la procédure de PCR. La contamination croisée entre les échantillons est minimisée car les cartouches sont indépendantes. Pour obtenir une description complète du système, consultez le *Manuel d'utilisation de DX GeneXpert System*.

Le test Xpert MRSA/SA SSTI comprend des réactifs pour la détection du SARM et du SA, ainsi qu'un contrôle du traitement de l'échantillon (CTE), pour contrôler le traitement approprié des bactéries cibles, ainsi que la présence d'inhibiteur(s) lors de la réaction PCR. Le CTE s'assure également que les conditions de réaction PCR (température et temps) sont appropriées pour la réaction d'amplification et que les réactifs PCR sont fonctionnels. Le contrôle de la sonde consiste à vérifier la réhydratation des réactifs, le remplissage des tubes de PCR dans la cartouche, l'intégrité de la sonde et la stabilité du fluorochrome.

Les amorces et les sondes du test Xpert MRSA/SA SSTI détectent les séquences brevetées de la protéine A staphylococcique (*spa*), le gène de résistance à la méthicilline (*mecA*) et la cassette chromosomique staphylococcique (SCC*mec*) insérée dans le site chromosomique *attB* du SA.

Réactifs et appareils

Matériel fourni

Le kit du test Xpert MRSA/SA SSTI contient suffisamment de réactifs pour traiter 10 échantillons ou contrôles qualité. Le kit contient les éléments suivants :

Cartouches de test Xpert MRSA/SA SSTI avec tubes réactionnels intégrés	**10**
Billes de réactifs 1,2 et 3 (lyophilisées)	**1 par cartouche**
Réactif 1 de test Xpert MRSA/SA SSTI	**2,8 ml par cartouche**
Réactif 2 de test Xpert MRSA/SA SSTI (hydroxyde de sodium)	**3,2 ml par cartouche**
Réactif d'élution de test Xpert MRSA/SA SSTI	**10**
Réactif d'élution (guanidine thiocyanate)	**1 x 2,0 ml par pochette**
CD	**1 par kit**
Fichier de définition de test (ADF)	
Instructions pour importer les ADF dans le logiciel GX	
Notice	

Remarques :

- Les fiches techniques de données de sécurité (SDS, Safety Data Sheets) sont disponibles à l'adresse : www.cepheid.com/tests-and-reagents/literature/msds ou www.cepheidinternational.com/tests-and-reagents/literature/msds.
- L'albumine de sérum bovin (BSA, bovine serum albumin) contenu dans les billes de ce produit a été produite exclusivement à partir de plasma bovin provenant des États-Unis. La fabrication du SAB est également réalisée aux États-Unis. Les aliments donnés aux animaux ne contenaient pas de protéines de ruminants ou d'autres protéines animales ; les animaux ont subi des tests ante et post mortem. Au cours du processus, aucun mélange ne s'est produit avec d'autres matières animales.

Stockage et manipulation

- Conservez les cartouches et les réactifs du test Xpert MRSA/SA SSTI à une température comprise entre 2 et 28 °C.
- N'utilisez pas les réactifs ou les cartouches dont la date d'expiration est dépassée.
- N'ouvrez pas de cartouche tant que vous n'êtes pas prêt à effectuer un test.
- Utiliser la cartouche et les réactifs dans les 30 minutes qui suivent l'ouverture de l'emballage.
- N'utilisez aucun réactif devenu trouble ou décoloré.

Matériel requis mais non fourni

- GeneXpert Dx System (la référence varie en fonction de la configuration) : Appareil GeneXpert, ordinateur, lecteur de codes-barres et manuel d'utilisation
- Imprimante (consultez le *Manuel d'utilisation de GeneXpert Dx System* pour obtenir des indications de compatibilité)
- Dispositif de collecte des échantillons de Cepheid (900-0370) ou équivalent de Copan
- Agitateur vortex
- Pipettes de transfert jetables
- Gaze stérile

Matériel disponible mais non fourni

Des écouvillons prêts à l'emploi KWIK-STIK™ (MicroBioLogics, nº de réf. 0158MRSA et 0360MSSA) comme contrôles positifs et nº de réf. 0371MSSE (*Staphylococcus epidermidis* sensible à la méthicilline) comme contrôles negatifs peuvent être utilisés.

Avertissements et précautions

- Traiter tous les échantillons biologiques, y compris les cartouches usagées, comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des agents infectieux. Puisqu'il est souvent impossible de savoir ce qui peut être infectieux, tous les échantillons biologiques doivent être traités en respectant les précautions standard. Les U.S. Centers for Disease Control and Prevention (centres américains pour le contrôle et la prévention des maladies)[8] et le Clinical and Laboratory Standards Institute (Institut des normes cliniques et de laboratoire, anciennement National Committee for Clinical Laboratory Standards)[9] tiennent à disposition des directives concernant la manipulation des échantillons.

  Une culture mixte contenant des SARM/SA et d'autres organismes (p. ex., bacilles gram négatif, levures) peut renvoyer des résultats négatifs erronés ou variables, selon la concentration de SARM/SA présente, en particulier si elle est proche de la LDD du test.

- Respectez les procédures de sécurité de votre institution pour la manipulation de produits chimiques et d'échantillons biologiques.
- Le test Xpert MRSA/SA SSTI peut détecter l'ADN de SARM et/ou de SA à partir d'organismes non viables. Cette probabilité augmente chez les patients sous antibiotiques.
- Le test Xpert MRSA/SA SSTI ne fournit pas de résultats aux tests de prédisposition antimicrobiens. Davantage de temps est nécessaire pour la culture et la réalisation de tests de prédisposition.
- Ne pas substituer le réactif du test Xpert MRSA/SA SSTI par d'autres réactifs.
- Ne pas ouvrir le couvercle de la cartouche du test Xpert MRSA/SA SSTI, sauf pour l'ajout de l'échantillon et du réactif, ou pour retester.
- Ne pas utiliser une cartouche qui est tombée ou qui a été agitée après avoir ajouté l'échantillon et le réactif.
- N'utilisez pas une cartouche dont le tube réactionnel est endommagé.
- Chaque cartouche de test Xpert MRSA/SA SSTI à usage unique est utilisée pour effectuer un seul test. Ne réutilisez pas des cartouches usagées.
- Adressez-vous au personnel de votre établissement chargé de la gestion environnementale des déchets afin de connaître les procédures correctes de mise au rebut des cartouches usagées et des réactifs non utilisés. Ces équipements peuvent présenter les caractéristiques des déchets dangereux selon la loi fédérale sur la conservation et la récupération des ressources (Resource Conservation and Recovery Act - RCRA) de l'EPA et donc nécessiter des mesures de mise au rebut spécifiques. Consultez les réglementations régionales et locales, qui peuvent différer de la réglementation fédérale. Les établissements situés hors des Etats-Unis doivent consulter la législation de leur pays relative à l'élimination des déchets dangereux.
- Conservez le kit du test Xpert MRSA/SA SSTI à une température comprise entre 2 et 28 ˚C.
- Ne pas ouvrir le couvercle de la cartouche avant d'être en mesure de réaliser le test.
- Le réactif d'élution contient du thiocyanate de guanidinium (risque H402, UE H301), qui est nocif pour les organismes aquatiques et qui, en contact avec de l'acide, libère un gaz toxique.
- Le réactif 2 contient de l'hydroxyde de sodium ; (risque H314) qui est corrosif pour les yeux et la peau, et exige une protection oculaire et cutanée.

Collecte, transport et stockage d'échantillons

Les échantillons d'infections de la peau et des tissus mous sur écouvillons peuvent être pris à l'aide du dispositif de collecte des échantillons de Cepheid, conformément aux pratiques standard de votre institution. Les écouvillons sont replacés dans le tube de transport en plastique (milieu de Stuart liquide, dispositif de collecte des échantillons de Cepheid ou dispositif recommandé de Copan), stockés à température ambiante et envoyés à la zone de test GeneXpert pour traitement dans les 24 heures suivantes. Les écouvillons non testés restants pour culture microbiologique doivent être placés dans des systèmes de transport appropriés et mis en culture dans les 4 jours. S'il n'est pas envoyé dans les 24 heures, l'échantillon doit être transporté sur glace. Les écouvillons peuvent également être stockés à une température comprise entre 2 et 8 ˚C pour être testés dans les 5 jours maximum.

Culture microbiologique

Pour les méthodes de culture concernant les infections de la peau et des tissus mous, respectez les consignes d'utilisation standard de votre laboratoire. Pour la culture, les échantillons sur écouvillons non testés restants doivent être placés dans des systèmes de transport appropriés et mis en culture dans les 4 jours.

Procédure

Préparation de la cartouche

Important : Démarrez le test dans les 15 minutes qui suivent l'ajout des réactifs à la cartouche.

Pour ajouter l'échantillon et le réactif à la cartouche :

1. Retirer la cartouche et le réactif de l'emballage.
2. Retirez l'écouvillon du récipient de transport.

Remarque : Utilisez de la gaze stérile lors de la manipulation de l'écouvillon pour réduire le risque de contamination.

3. Insérez l'écouvillon dans le tube contenant le réactif d'élution, puis cassez l'écouvillon.
4. Fermez le couvercle du flacon d'élution et vortexez à vitesse élevée pendant 10 secondes.
5. Ouvrez le couvercle de la cartouche. Utilisez une pipette de transfert stérile et transférez le contenu complet du réactif d'élution dans la chambre marquée « S » de la cartouche de test Xpert MRSA/SA SSTI.
6. Fermez le couvercle de la cartouche.

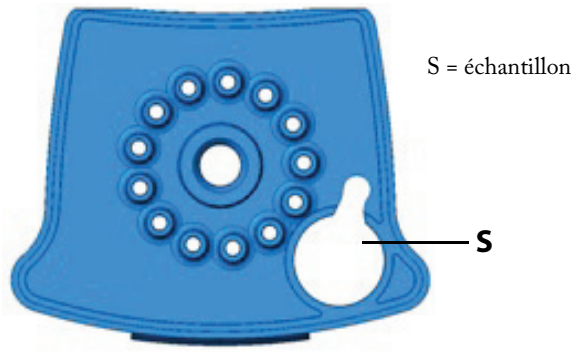

Figure 1. Cartouche de test Xpert MRSA/SA SSTI (vue de dessus)

Démarrage du test

Important : Avant de démarrer le test, assurez-vous que le fichier de définition du test Xpert MRSA/SA SSTI est importé dans le logiciel.

Cette section répertorie les étapes de base de la réalisation du test. Pour obtenir des instructions détaillées, consultez le *Manuel d'utilisation de GeneXpert Dx System*.

1. Allumer l'instrument GeneXpert Dx puis allumer l'ordinateur. Le logiciel GeneXpert démarrera automatiquement.
2. Ouvrez une session du logiciel GeneXpert Dx System en utilisant votre nom d'utilisateur et votre mot de passe.
3. Dans la fenêtre de **GeneXpert Dx System**, cliquez sur **Create Test** (**Créer un test**). La boîte de dialogue **Scan Cartridge Barcode** (**scanner le code-barres de la cartouche**) s'affiche.
4. Lisez le code-barres de la cartouche du test Xpert MRSA/SA SSTI. La fenêtre **Create Test** (**Créer un test**) apparaît. En utilisant les informations du code-barres, le logiciel complète automatiquement les cases des champs suivants : Select Assay (Sélectionner un test), Reagent Lot ID (N° Id du lot de réactifs), Cartridge SN (Cartouche SN) et Expiration Date (Date limite d'utilisation).
5. Dans la case **Sample ID** (**N° Id de l'échantillon**), scannez ou saisissez le numéro d'identification de l'échantillon. Assurez-vous de saisir le numéro d'identification correct. Le numéro d'identification de l'échantillon est associé aux résultats du test et affiché dans la fenêtre **View results** (**Afficher les résultats**) et dans tous les rapports.
6. Cliquez sur **Start Test** (**Démarrer le test**). Dans la boîte de dialogue qui apparaît, saisissez votre mot de passe.
7. Ouvrez la porte du module de l'appareil dont le voyant vert clignote et chargez la cartouche.
8. Fermez la porte. Le test démarre et le voyant vert cesse de clignoter. Lorsque le test est terminé, le voyant s'éteint.
9. Attendez que le système déverrouille la porte du module avant de l'ouvrir et de retirer la cartouche.
10. Les cartouches usagées doivent être éliminées dans les conteneurs à déchets pour échantillons appropriés, conformément aux pratiques standard de votre institution.

Affichage et impression des résultats

Pour obtenir des instructions détaillées sur la manière d'afficher et d'imprimer les résultats, consultez le *Manuel d'utilisation de GeneXpert Dx System*.

CONTROL

Contrôle qualité

Contrôles qualité intégrés

Chaque test comprend un contrôle du traitement de l'échantillon (CTE ou BG3 dans l'écran d'affichage des résultats pour l'utilisateur de niveau administrateur) et un contrôle de la sonde.

- **Contrôle du traitement de l'échantillon (CTE)** : vérifie que l'échantillon a été correctement traité. Le CTE comprend des spores de *Bacillus globigii* sous la forme d'un biscuit sec de spores, placé dans chaque cartouche afin de vérifier le bon déroulement du traitement de l'échantillon du test Xpert MRSA/SA SSTI. Le CTE vérifie que la lyse de *Staphylococcus aureus* a eu lieu si les organismes sont présents et contrôle que le traitement de l'échantillon est adéquat. En outre, ce contrôle détecte l'inhibition associée à l'échantillon du test de PCR en temps réel, vérifie que les conditions de réaction PCR (température et temps) sont appropriées pour la réaction d'amplification et que les réactifs PCR sont fonctionnels. Le CTE doit être positif dans un échantillon négatif et peut être négatif ou positif dans un échantillon positif. Le CTE réussit s'il répond aux critères d'acceptation validés.
- **Contrôle de la sonde** : avant de démarrer la réaction PCR, le GeneXpert Dx System mesure le signal de fluorescence provenant des sondes, afin de contrôler la réhydratation des billes de réactifs, le remplissage des tubes réactionnels, l'intégrité de la sonde et la stabilité du fluorochrome. Le contrôle de la sonde réussit s'il répond aux critères d'acceptation attribués.

Contrôles externes

- Des écouvillons prêts à l'emploi KWIK-STIK (MicroBioLogics, nº de réf. 0158 MRSA [SCC*mec* type II] et nº de réf. 0360SA comme contrôles positifs, et nº de réf. 0371MSSE comme contrôle négatif) peuvent être utilisés avec le GeneXpert Dx System pour la formation des opérateurs, les épreuves de compétence et le CQ externe. Les éventuelles souches de SARM présentant d'autres types SCC*mec* sont utilisables comme contrôles positifs externes supplémentaires pour contrôler les amorces du test et les sondes non directement contrôlées dans le test. Les contrôles externes peuvent être utilisés en accord avec les organisations d'accréditation et les réglementations gouvernementales, comme approprié. Suivez la procédure de contrôle externe de MicroBioLogics décrite ci-dessous :
  1. Déchirez l'étui au niveau de l'entaille et retirez le KWIK-STIK.
  2. Pincez le bas de l'ampoule, dans le couvercle, pour libérer le liquide hydratant.
  3. Veillez à tenir l'ampoule verticalement et à la tapoter, pour faciliter l'écoulement du liquide à travers la tige dans le fond de l'unité contenant la pastille.
  4. Pour faciliter la dissolution de la pastille de cellules lyophilisées, écrasez la pastille et pincez doucement la chambre du fond.
  5. Détachez le KWIK-STIK pour libérer l'écouvillon et insérez celui-ci dans le tube contenant le réactif d'élution (couvercle à visser).
  6. L'écouvillon KWIK-STIK est alors prêt pour le test Xpert MRSA/SA SSTI.
  7. Si le contrôle qualité externe ne présente pas les résultats escomptés, répétez le test de contrôle externe et/ou contactez Cepheid pour obtenir de l'aide.

Les Figures 2 à 5 présentent des exemples de résultats de tests utilisant le test Xpert MRSA/SA SSTI Assay.

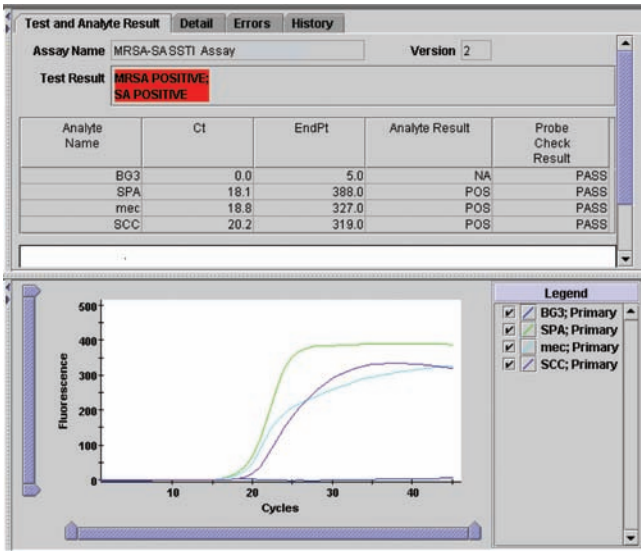

Figure 2. Exemple d'un résultat MRSA Positive/SA Positive (positif à SARM/positif à SA)

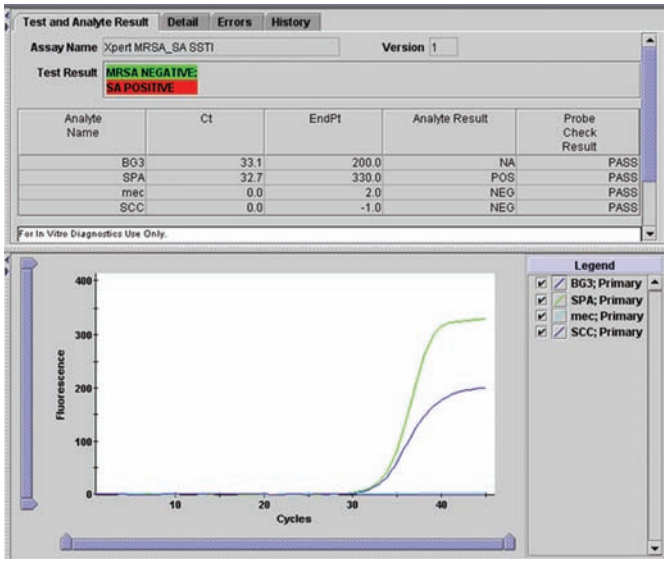

Figure 3. Exemple d'un résultat MRSA Negative/SA Positive (négatif à SARM/positif à SA)

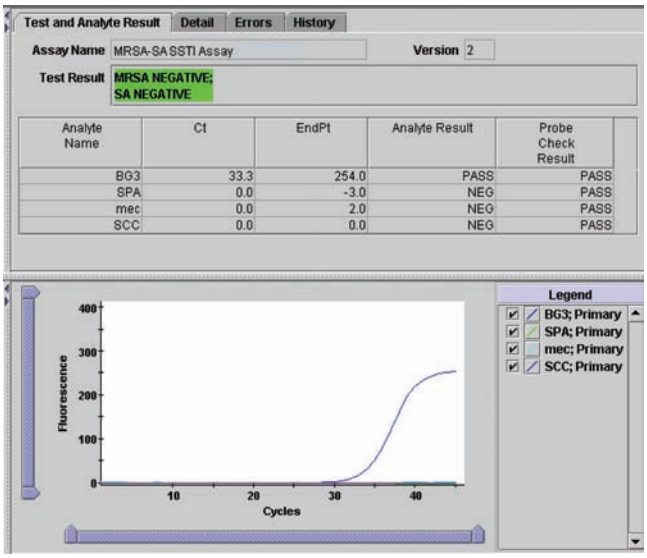

Figure 4. Exemple d'un résultat MRSA Negative/SA Negative (négatif à SARM/négatif à SA)

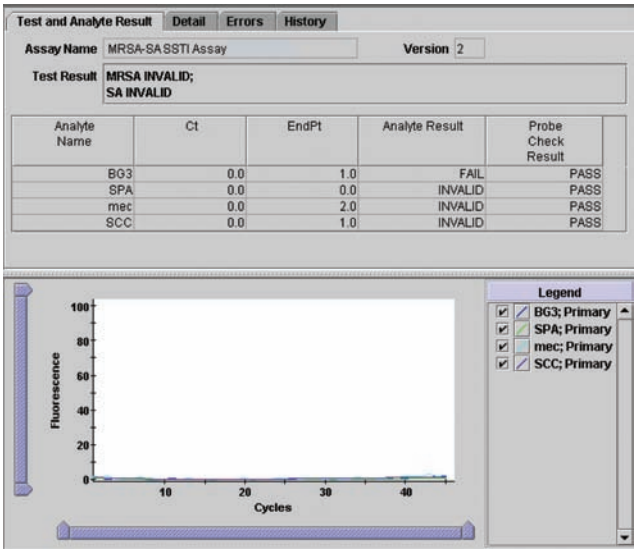

Figure 5. Exemple de résultat non valide

Interprétation des résultats

Les résultats sont interpolés par le GeneXpert Dx System à partir de signaux fluorescents mesurés et d'algorithmes de calcul intégrés. Ils seront affichés dans la fenêtre **View Results** (**Afficher les résultats**). Les résultats possibles sont :

MRSA POSITIVE/SA POSITIVE (SARM POSITIF/SA POSITIF)
Le test Xpert MRSA/SA SSTI peut détecter l'ADN de SARM et/ou de SA à partir d'organismes non viables.

Les séquences d'ADN cible de SARM sont détectées/la séquence d'ADN cible de SA est détectée.

- MRSA POSITIVE (SARM POSITIF) – toutes les cibles du SARM (*spa*, *mecA* et SCC*mec*) présentent un seuil de cycle (Ct) compris dans la gamme valide et la valeur finale se situe au-dessus de la valeur finale minimale requise.
- SPC (CTE) – NA (sans objet) ; le CTE est ignoré parce que l'amplification SARM peut s'opposer à ce contrôle.
- Probe Check – PASS (Contrôle de la sonde réussi) ; tous les résultats du contrôle de la sonde sont réussis.

MRSA NEGATIVE/SA POSITIVE (SARM NÉGATIF/SA POSITIF)
Le test Xpert MRSA/SA SSTI peut détecter l'ADN de SARM et/ou de SA à partir d'organismes non viables.

- Les séquences d'ADN cible de SARM ne sont pas détectées/la séquence d'ADN cible de SA est détectée.
- SA POSITIVE (SA POSITIF) – la cible du SA (*spa*) présente un Ct compris dans la gamme valide et sa valeur finale se situe au-dessus de la valeur minimale. L'ADN cible pour le SCC*mec* n'est pas détecté, l'ADN cible pour le *mecA* peut être détecté ou non, ou l'ADN cible pour le SCC*mec* est détecté et l'ADN cible pour le *mecA* n'est pas détecté (« cassette vide »).
- SPC (CTE) – NA (sans objet) ; le CTE est ignoré parce que l'amplification SA peut s'opposer à ce contrôle.
- Probe Check – PASS (Contrôle de la sonde réussi) ; tous les résultats du contrôle de la sonde sont réussis.

Un résultat de test positif n'indique pas forcément la présence d'organismes viables. Cependant, il suppose la présence du SARM ou SA.

MRSA NEGATIVE/SA NEGATIVE (SARM NÉGATIF/SA NÉGATIF)
La séquence d'ADN cible du *Staphylococcus aureus* n'est pas détectée. Le CTE satisfait aux critères d'acceptation.

- NEGATIVE (NÉGATIF) – l'ADN cible du *Staphylococcus aureus* (*spa*) n'est pas détecté. L'ADN cible du *mecA* est détecté ou non, ou l'ADN cible du SCC*mec* est détecté ou non.
- SPC – PASS (CTE réussi) ; le CTE présente un Ct compris dans la gamme valide et sa valeur finale se situe au-dessus de la valeur finale minimale requise.
- Probe Check – PASS (Contrôle de la sonde réussi) ; tous les résultats du contrôle de la sonde sont réussis.

Un faux résultat négatif pour le SARM (résultat « MRSA NEGATIVE; SA POSITIVE » au lieu de « MRSA POSITIVE; SA POSITIVE ») peut être obtenu en présence de SARM et de SA dans l'échantillon avec un rapport SARM:SA égal ou supérieur à $1{:}1x10^6$.

Dans les études cliniques, 5 des 246 cultures positives au SARM présentaient des infections mixtes au SARM et au SA. Xpert MRSA/SA SSTI a identifié 3 des 5 infections mixtes comme positives au SARM et les 2 autres comme positives au SA/négatives au SARM.

INVALID (non valide)
La présence ou l'absence de séquences d'ADN cibles du SARM/SA ne peut pas être déterminée, répétez le test conformément aux instructions de la section suivante. Le CTE ne satisfait pas aux critères d'acceptation, l'échantillon n'a pas été traité correctement ou la PCR était inhibée.

- INVALID (NON VALIDE) – impossible de déterminer la présence ou l'absence d'ADN de *Staphylococcus aureus*.
- SPC-FAIL (CTE-ÉCHEC) – le résultat cible du CTE est négatif ; le Ct du CTE n'est pas compris dans la gamme valide et sa valeur finale se situe au-dessous de la valeur finale minimale requise.
- Probe Check – PASS (Contrôle de la sonde réussi) ; tous les résultats du contrôle de la sonde sont réussis.

ERROR (ERREUR)
La présence ou l'absence de séquences d'ADN cibles du SARM/SA ne peut pas être déterminée, répétez le test conformément aux instructions de la section suivante. L'échec du contrôle de la sonde est probablement dû au remplissage incorrect du tube réactionnel, un problème d'intégrité de la sonde a été détecté ou les limites maximales de pression ont été dépassées.

- MRSA (SARM) – NO RESULT (PAS DE RÉSULTAT)
- SA – NO RESULT (PAS DE RÉSULTAT)
- SPC – NO RESULT (CTE : PAS DE RÉSULTAT)
- Probe Check (Contrôle de la sonde) : FAIL* (ÉCHEC*) ; échec d'un ou de plusieurs résultats de contrôle de la sonde.

* Si le contrôle de la sonde a réussi, l'erreur est provoquée par l'échec d'un composant du système.

NO RESULT (pas de résultat)
La présence ou l'absence de séquences d'ADN cibles du SARM/SA ne peut pas être déterminée, répétez le test conformément aux instructions de la section suivante. Trop peu de données ont été collectées pour produire un résultat de test. Par exemple, cela peut se produire si l'opérateur a interrompu un test en cours.

- MRSA (SARM) – NO RESULT (PAS DE RÉSULTAT)
- SA – NO RESULT (PAS DE RÉSULTAT)
- SPC – NO RESULT (CTE : PAS DE RÉSULTAT)
- Probe Check – NA (Contrôle de la sonde : sans objet)

Raisons pour lesquelles le test doit être répété

Répétez le test à l'aide d'une nouvelle cartouche (ne réutilisez pas la cartouche) et de nouveaux réactifs. Répétez la procédure de test dans les 3 heures suivant un résultat indéterminé.

Le résultat INVALID (NON VALIDE) indique que le CTE a échoué. L'échantillon n'a pas été traité correctement ou la PCR est inhibée.

Le résultat ERROR (ERREUR) indique l'échec du contrôle de la sonde et l'interruption du test, probablement à cause du remplissage incorrect du tube de réaction, de la détection d'un problème d'intégrité de la sonde de réactif ou du dépassement des limites maximales de pression.

Le résultat NO RESULT (PAS DE RÉSULTAT) indique que trop peu de données ont été collectées. Par exemple, l'opérateur a interrompu un test en cours.

Si le contrôle qualité externe ne présente pas les résultats escomptés, répétez le test de contrôle externe et/ou contactez Cepheid pour obtenir de l'aide.

Pour répéter un test :

Pour la répétition d'un test dans les 3 heures suivant un résultat indéterminé* :

1. Transférez le reste du contenu de la chambre S vers un nouveau réactif d'élution à l'aide d'une pipette de transfert jetable.
2. Vortexez et ajoutez le contenu complet du réactif d'élution dans la chambre S de la nouvelle cartouche de test MRSA/SA SSTI.
3. Fermez le couvercle et démarrez le nouveau test.

* Si le test ne peut pas être répété dans les 3 heures, utilisez un nouvel échantillon.

Restrictions

Les performances du test Xpert MRSA/SA SSTI ont été validées en utilisant uniquement les procédures fournies dans cette notice. Des modifications apportées à ces procédures peuvent modifier les performances du test. Les résultats du test Xpert MRSA/SA SSTI doivent être interprétés conjointement avec d'autres données de laboratoire et cliniques à la disposition du clinicien.

Le test Xpert MRSA/SA SSTI peut détecter l'ADN de SARM et/ou de SA à partir d'organismes non viables. Cette probabilité augmente chez les patients sous antibiotiques. Dans l'essai clinique clé, le taux de faux résultats positifs (par rapport à la culture) de détection de SA chez des patients sous antibiotiques, dans les 3 semaines précédant le test Xpert MRSA/SA, était de 13,8 %. Le taux de faux résultats positifs (par rapport à la culture) de détection de SARM chez des patients sous antibiotiques, dans les 3 semaines précédant le test Xpert MRSA/SA, était de 9,5 %.

Un résultat de test positif n'indique pas forcément la présence d'organismes viables. Cependant, il suppose la présence du SARM ou SA.

Le test Xpert MRSA/SA SSTI doit venir en complément des autres méthodes disponibles.

Des résultats de test erronés peuvent résulter d'une collecte d'échantillon inadéquate (ne suivant pas la procédure de collecte d'échantillon recommandée), de procédures de manipulation et de stockage inadéquates, d'une erreur technique, d'une confusion d'échantillons ou d'un nombre d'organismes dans l'échantillon insuffisant pour permettre une détection. Il est nécessaire de respecter scrupuleusement les instructions de cette notice pour éviter des résultats erronés.

La fiabilité des résultats dépend d'une collecte d'échantillon adéquate, d'une manipulation et d'un stockage corrects car la détection du SARM et du SA repose sur le nombre d'organismes présents dans l'échantillon.

Des mutations ou des polymorphismes dans les régions de fixation de l'amorce ou de la sonde peuvent affecter la détection de variantes du SARM nouvelles ou inconnues, entraînant un résultat négatif erroné.

Dans les échantillons contenant à la fois des SARM et des SA, le test Xpert MRSA/SA SSTI peut être incapable de détecter les organismes SA résistants à la méthicilline. (Dans l'essai clinique clé, le test Xpert MRSA/SA SSTI n'a pas pu détecter 2 des 5 cultures positives au SARM dans des situations où des infections mixtes au SARM/SA étaient documentées.)

Dans une culture mixte, la LDD analytique du SARM est variable en présence de concentrations extrêmement élevées de SA. La concurrence du SA a été observée avec un rapport SARM:SA de $1:1x10^6$. Dans les études cliniques, 5 des 246 cultures positives au SARM présentaient des infections mixtes au SARM et au SA. Xpert MRSA/SA SSTI a identifié 3 des 5 infections mixtes comme positives au SARM et les 2 autres comme positives au SA/négatives au SARM.

Une inhibition du test MRSA/SA SSTI a été observée avec les substances suivantes : StaphA $^+$Septic (5 % m/v), hydrocortisone (5 % m/v) et désinfectant antibactérien pour les mains (5 % m/v).

Les échantillons contenant du mercurochrome ne doivent pas être utilisés en raison de sa nature fluorescente.

Le test Xpert MRSA/SA SSTI génèrera un faux résultat positif au SARM lors du test d'un échantillon présentant une infection mixte de la peau et des tissus mous, contenant à la fois des *staphylocoques* à coagulase négative résistants à la méthicilline (SCNRM) et des *Staphylococcus aureus* (SA) sensibles à la méthicilline à cassette vide.

Substances parasites

Dans l'étude du test Xpert MRSA/SA SSTI, 428 des 848 échantillons se sont avérés contenir du sang et 404 contenaient d'autres substances non spécifiques, susceptibles d'interférer avec le test (notez que certains échantillons contenaient plusieurs types de contaminants potentiels). La méthode exacte de Fisher appliquée sur les données générées à partir des écouvillons comportant ou non ces substances parasites potentielles a démontré que leur présence n'affectait pas les performances du test.

Dans une étude non clinique, les substances parasites potentielles pouvant être présentes dans des échantillons cliniques d'infections de la peau et des tissus mous ont été directement évaluées en comparaison avec les performances du test Xpert MRSA/SA SSTI. Les substances parasites potentielles dans les infections de la peau et des tissus mous peuvent inclure, sans s'y limiter : le sang, le pus, le plasma, les pommades topiques (antibiotiques/antiseptiques/antalgiques), les agents de parage et les teintures. Ces substances figurent aux tableaux 1 et 2, avec les ingrédients actifs et les concentrations testés. Une inhibition du test MRSA/SA SSTI a été observée avec les substances suivantes : StaphA $^{+}$Septic (5 % m/v), hydrocortisone (5 % m/v) et désinfectant antibactérien pour les mains (5 % m/v).

Les échantillons contenant du mercurochrome ne doivent pas être utilisés en raison de sa nature fluorescente.

Tableau 1. Substances parasites potentielles testées pour les SSTI

Substance	Ingrédient actif	% testé
Tampon TET (contrôle)	Contrôle	Contrôle
Couche leuco-plaquettaire (substitut de plaie)	Leucocytes (1,5e9/ml)	50 % (v/v)
Sang total (sans SARM/SA)	SO	50 % (v/v)
Plasma	SO	50 % (v/v)
Neosporin	400 unités de bacitracine 5 000 unités de polymyxine B 3,5 mg de néomycine	1 % et 5 % (m/v)
StaphA^{+}Septic	0,2 % de chlorure de benzéthonium, 2,5 % de lidocaïne	1 % et 5 % (m/v)
Hydrocortisone	1 % d'hydrocortisone	1 % et 5 % (m/v)
Boil-Ease	20 % de benzocaïne	1 % et 5 % (m/v)
Teinture d'iode	2 % d'iode	50 % (v/v)

Tableau 2. Substances parasites potentielles testées pour les SSTI

Substance	Ingrédient actif	% testé
Tampon TET (contrôle)	Contrôle	Contrôle
Mupirocine	0,2 % de chlorure de benzéthonium, 2,5 % de lidocaïne	5 % (m/v)
Sang total (sans SARM/SA)	SO	50 % (v/v)
Sérum physiologique	0,65 % de chlorure de sodium	50 % (v/v)
Désinfectant antibactérien pour les mains	62 % d'alcool éthylique	1 % et 5 % (m/v)
70 % d'isopropanol	70 % d'isopropanol	50 % (v/v)

Valeurs attendues

L'étude clinique Xpert MRSA/SA SSTI portait sur un total de 848 échantillons d'infections de la peau et des tissus mous provenant de quatre grande hôpitaux des États-Unis. Le nombre et le pourcentage de cas positifs par la méthode de culture de référence, calculés par groupe d'âge, sont présentés au Tableau 3.

Tableau 3. Prévalence observée du SARM et du SA par culture

Groupe d'âge	Total N	SARM par culture		SA par culture	
		Nombre positifs	Prévalence observée	Nombre positifs	Prévalence observée
Moins de 3 ans	34	11	32,4 %	21	61,8 %
De 3 à 18 ans	100	25	25,0 %	55	55,0 %
De 19 à 65 ans	614	188	30,6 %	300	48,9 %
66 ans et plus	100	22	22,0 %	35	35,0 %

Caractéristiques des performances

Performances cliniques

Les caractéristiques de performances du test Xpert MRSA/SA SSTI ont été déterminées dans le cadre d'une étude de cohorte multisite menée dans quatre institutions américaines et reposant sur la comparaison du test Xpert MRSA/SA SSTI avec une culture de référence. Les sujets comprenaient des individus dont les soins de routine exigeaient l'utilisation d'un écouvillon sur l'infection de la peau et des tissus mous pour une culture.

Des écouvillons doubles ont été recueillis pour chaque sujet. L'un des écouvillons a été utilisé pour le test Xpert MRSA/SA SSTI au centre de sélection, tandis que l'autre a été testé à l'aide de la méthode standard du site, le reste des échantillons étant envoyé au laboratoire central à des fins de test de culture de référence.

Au laboratoire central, l'échantillon a été enrichi durant une nuit dans un bouillon de soja trypticase avec 6,5 % de NaCl. Le bouillon de soja trypticase a ensuite été ensemencé sur des plaques avec (pour le SARM) et sans céfoxitine (pour le SA). Si la plaque SA et/ou SARM comportait des colonies supposées infectées par le *S. aureus*, ces colonies étaient mises en subculture sur gélose au sang. La confirmation des colonies supposées positives a été effectuée par catalase, par test de coagulase en tube et par coloration de Gram. La résistance à l'oxacilline liée au gène *MecA* a été testée par diffusion de disque en utilisant un disque de céfoxitine de 30 µg et une limite de 21/22 mm. Si les cultures des plaques SA et SARM se sont révélées négatives, le bouillon de soja trypticase archivé avec 6,5 % de NaCl a été mis en subculture sur gélose au sang pour une investigation du SA/SARM, comme décrit précédemment.

Les performances du test Xpert MRSA/SA SSTI sont résumées dans les Tableaux 4 à 6.

Résultats généraux

Au total, 848 échantillons ont été testés à la recherche de SARM et de SA par le test Xpert MRSA/SA SSTI et par culture.

Parmi les 848 cas figurant dans les jeux de données admissibles, l'utilisation d'antibiotiques dans les 3 semaines précédant la collecte des échantillons a été signalée chez 207 sujets et l'absence d'administration d'antibiotiques a été confirmée pour 441 sujets ; pour 200 cas, l'usage éventuel d'antibiotiques était inconnu. Une baisse statistiquement significative du taux de positivité au SA par rapport aux résultats de culture a été observée en cas d'administration d'antibiotiques (p=0,007) ; ce phénomène a également été rapporté dans la littérature.[10, 11, 12, 13, 14] Le taux de positivité au SARM pour la culture a également été réduit, dans une moindre mesure (p=0,022). Le baisse du taux de positivité n'a pas été observée avec le test Xpert MRSA/SA SSTI en association avec des antibiotiques. En outre, aucune inhibition n'a été observée dans le test en présence d'antibiotiques topiques (voir Substances parasites). La baisse du taux de positivité des cultures pour le SARM et le SA en présence d'antibiotiques a entraîné l'obtention d'un taux de faux résultats positifs supérieur aux attentes observé avec le test Xpert MRSA/SA SSTI.

Cinq (5) des 246 cultures positives au SARM présentaient des infections mixtes au SARM et au SA. Xpert MRSA/SA SSTI a identifié 3 des 5 infections mixtes comme positives au SARM et les 2 autres comme positives au SA/négatives au SARM.

Les performances du test Xpert MRSA/SA SSTI sont résumées dans les tableaux 4 à 6.

Tableau 4. Performances de détection de SARM/SA chez les sujets n'utilisant pas d'antibiotiques (dans les 3 semaines précédant la collecte des échantillons) par rapport à la culture de référence

		Culture			
		SARM+	**SA+/SARM-**	**Nég/pas de croissance**	**Total**
Xpert	SARM+	137[a]	2	6	145
	SA+/SARM-	3[b]	79	16	98
	SA-	6	4	188	198
	Total	146	85	210	441

[a] Un des 137 échantillons présentait une infection mixte au SARM et au SA.
[b] Deux des 3 échantillons présentaient une infection mixte au SARM et au SA.

Correspondance de pourcentage positif (SARM+) = 93,8 ; intervalle de confiance à 95 % = 88,6 – 97,1

Correspondance de pourcentage négatif (SARM+) = 97,3 ; intervalle de confiance à 95 % = 94,7 – 98,8

Correspondance de pourcentage positif (SA+/SARM+) = 95,7 ; intervalle de confiance à 95 % = 92,2 – 97,9

Correspondance de pourcentage négatif (SA+/SARM+) = 89,5 ; intervalle de confiance à 95 % = 84,6 – 93,3

Parmi les sujets n'ayant pas reçu d'antibiotiques dans les 3 semaines précédant la collecte des échantillons, le test Xpert MRSA/SA SSTI a identifié 93,8 % des échantillons positifs au SARM et 97,3 % des échantillons négatifs au SARM par rapport à la méthode de culture de référence, ainsi que 95,7 % des échantillons positifs au SA et 89,5 % de ceux négatifs au SA par rapport à la méthode de culture de référence.

Parmi les sujets n'ayant pas utilisé d'antibiotiques, 96,8 % (427/441) des échantillons ont réussi à recevoir un résultat dès la première tentative avec le test Xpert MRSA/SA SSTI. Les 14 échantillons restants ont obtenu des résultats indéterminés lors de la première tentative (6 « INVALID », 7 « ERROR » et 1 « NO RESULT »). Ils ont toutefois tous reçu un résultat à la seconde tentative.

Tableau 5. Performances de détection de SARM/SA chez les sujets dont l'utilisation éventuelle d'antibiotiques est inconnue (dans les 3 semaines précédant la collecte des échantillons) par rapport à la culture de référence

		Culture			
		SARM+	**SA+/SARM-**	**Nég/pas de croissance**	**Total**
Xpert	SARM+	47[c]	0	4	51
	SA+/SARM-	2	45	8	55
	SA-	1	2	91	94
	Total	50	47	103	200

[c] Deux des 47 échantillons présentaient une infection mixte au SARM et au SA.

Correspondance de pourcentage positif (SARM+) = 94,0 ; intervalle de confiance à 95 % = 83,5 – 98,7

Correspondance de pourcentage négatif (SARM+) = 97,3 ; intervalle de confiance à 93,3 % = 94,7 – 99,3

Correspondance de pourcentage positif (SA+/SARM+) = 96,9 ; intervalle de confiance à 95 % = 91,2 – 99,4

Correspondance de pourcentage négatif (SA+/SARM+) = 88,3 ; intervalle de confiance à 95 % = 80,5 – 93,8

Parmi les sujets dont l'usage éventuel d'antibiotiques dans les 3 semaines précédant la collecte des échantillons était inconnu, le test Xpert MRSA/SA SSTI a identifié 94,0 % des échantillons positifs au SARM et 97,3 % des échantillons négatifs au SARM par rapport à la méthode de culture de référence, ainsi que 96,9 % des échantillons positifs au SA et 88,3 % de ceux négatifs au SA par rapport à la méthode de culture de référence.

Parmi les sujets dont on ignorait s'ils avaient reçu des antibiotiques ou non, 97,0 % (194/200) des échantillons ont réussi à recevoir un résultat dès la première tentative avec le test Xpert MRSA/SA SSTI. Les 6 échantillons restants ont obtenu des résultats indéterminés lors de la première tentative (2 « INVALID », 3 « ERROR » et 1 « NO RESULT »). Ils ont toutefois tous reçu un résultat à la seconde tentative.

Tableau 6. Performances de détection de SARM/SA chez les sujets ayant été traités par antibiotiques (dans les 3 semaines précédant la collecte des échantillons) par rapport à la culture de référence

		Culture			
		SARM+	**SA+/SARM-**	**Nég/pas de croissance**	**Total**
Xpert	SARM+	44	2	10	56
	SA+/SARM-	3	31	19	53
	SA-	3	1	94	98
	Total	50	34	123	207

Correspondance de pourcentage positif (SARM+) = 88,0 ; intervalle de confiance à 95 % = 75,7 – 95,5

Correspondance de pourcentage négatif (SARM+) = 92,4 ; intervalle de confiance à 87,0 % = 94,7 – 96,0

Correspondance de pourcentage positif (SA+/SARM+) = 95,2 ; intervalle de confiance à 95 % = 88,3 – 98,7

Correspondance de pourcentage négatif (SA+/SARM+) = 76,4 ; intervalle de confiance à 95 % = 67,9 – 83,6

Parmi les sujets ayant été traités par antibiotiques dans les 3 semaines précédant la collecte des échantillons, le test Xpert MRSA/SA SSTI a identifié 88,0 % des échantillons positifs au SARM et 92,4 % des échantillons négatifs au SARM par rapport à la méthode de culture de référence, ainsi que 95,2 % des échantillons positifs au SA et 76,4 % de ceux négatifs au SA par rapport à la méthode de culture de référence.

Parmi les sujets traités par antibiotiques, 96,1 % (199/207) des échantillons admissibles ont réussi à recevoir un résultat dès la première tentative avec le test Xpert MRSA/SA SSTI. Les 8 échantillons restants ont obtenu des résultats indéterminés lors de la première tentative (5 « INVALID » et 3 « ERROR »). Ils ont toutefois tous reçu un résultat à la seconde tentative.

Variantes à cassette vide

Pour identifier un isolat comme positif au SARM avec le test Xpert MRSA/SA SSTI, le test du *spa* doit être positif, ainsi que le test du *mecA* et du SCC*mec*. Un isolat positif pour les gènes *spa* et SCC*mec*, mais pas pour le gène *mecA* est signalé positif au SA car il est sensible à la méthicilline. Cette situation peut survenir lorsque la partie de l'élément SCC*mec* portant le gène *mecA* est excisée, alors que les extrémités de cet élément mobile restent en place, ce qui renvoie un signal SCC*mec* positif. Ces isolats, parfois appelés « variantes à cassette vide », ne sont pas rares dans un environnement clinique. La signification de ces isolats risque d'être confuse pour un test de SARM qui ne détecte pas directement le gène *mecA*. Néanmoins, le test Xpert MRSA/SA SSTI a été développé de manière à identifier correctement ces variantes comme SA.

Parmi les échantillons admissibles inclus dans les analyses de données présentées dans ce rapport, un total de 16 isolats correspondent au profil à cassette vide, ce qui entraîne un résultat positif au test du *spa* et du SCC*mec*, sans détection du gène *mecA* (Ct = 0), comme illustré au tableau 7. Quinze (15) de ces 16 isolats ont reçu un vrai résultat négatif au SARM vérifié par rapport à la culture, et 14 des 16 isolats ont reçu un vrai résultat positif au SA vérifié par rapport à la culture. Un isolat a été identifié comme positif au SARM par culture et 2 isolats ont été identifiés comme négatifs au SARM et au SA par la culture.

Tableau 7. Performances du test MRSA/SA SSTI par rapport à la culture de référence — Variantes à cassette vide

Nº sujet	Xpert Résultat	spa (Ct)	mecA (Ct)	SCC*mec* (Ct)	Culture	Xpert par rapport à la culture SARM	SA
1	SA	23,6	0	26,0	SA	TN	VP
2	SA	14,7	0	16,5	SA	TN	VP
3	SA	20,5	0	34,0	SA	TN	VP
4	SA	18,4	0	21,0	SA	TN	VP
5	SA	15,6	0	28,4	SARM	FN	VP
6	SA	17,2	0	31,6	SA	TN	VP
7	SA	34,1	0	35,6	Nég	TN	FP
8	SA	29,1	0	33,0	SA	TN	VP
9	SA	12,7	0	23,5	SA	TN	VP
10	SA	18,2	0	27,6	SA	TN	VP
11	SA	18,4	0	22,0	SA	TN	VP
12	SA	25,5	0	27,7	SA	TN	VP
13	SA	20,0	0	22,1	Nég	TN	FP
14	SA	26,0	0	28,3	SA	TN	VP
15	SA	23,9	0	25,7	SA	TN	VP
16	SA	19,9	0	34,0	SA	TN	VP

Performances analytiques

Spécificité analytique

Étude de réactivité croisée

Cent cinq (105) souches ont été collectées, quantifiées et testées à l'aide du test Xpert MRSA/SA SSTI. Les 98 cultures provenant de l'ATCC (American Type Culture Collection) et les 7 souches du NARSA (Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus*) représentent des espèces phylogénétiquement proches du *Staphylococcus aureus* ou potentiellement présentes dans un environnement hospitalier.

Elles comprenaient des staphylocoques à coagulase négative sensibles à la méthicilline (29) et des staphylocoques à coagulase négative résistants à la méthicilline (9). Les organismes testés ont été identifiés comme espèces à Gram positif (74), à Gram négatif (28) ou comme levures (3). Ils ont également été classifiés comme aérobies (95) ou anaérobies (10).

Deux (2) réplicats ou plus de chaque isolat ont été testés dans la plage de 1,7 à 3,2 unités McFarland. Dans les conditions de l'étude, tous les isolats ont été déclarés négatifs au SARM et au SA ; aucun des isolats n'a été détecté par le test Xpert MRSA/SA SSTI. Des témoins positifs et négatifs étaient inclus dans l'étude. La spécificité analytique était de 100 %.

Évaluation de souches BORSA

Sept (7) souches de *Staphylococcus aureus* à résistance de bas niveau à l'oxacilline (BORSA) ont été testées, dont une semblant présenter une variante « à cassette vide » (voir ci-dessus). Le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline est résistant à tous les médicaments ß-lactam en raison de la protéine alternative PBP2a liant la pénicilline, qui est encodée par le gène *mecA*[15]. Les souches BORSA sont négatives au *mecA*, mais présentent une concentration minimale inhibitrice (CMI) d'oxacilline ≥ 2 et ≤ 8 µg/ml. Il est particulièrement nécessaire de distinguer le SARM du BORSA pour éviter l'utilisation superflue et inappropriée de vancomycine et de mesures d'isolation, qui ne s'imposent pas pour les patients infectés par une souche sensible au ß-lactam[16].

Dans les conditions de cette étude, les 7 isolats BORSA (y compris la variante « à cassette vide » apparente) ont obtenu un résultat négatif au SARM/positif au SA à des concentrations cellulaires élevées et faibles à l'aide du test Xpert MRSA/SA SSTI. Aucun signal *mecA* n'a été rapporté. Ces résultats démontrent qu'une souche BORSA sera correctement identifiée comme négative au SARM/positive au SA et n'obtiendra pas de faux résultat positif au SARM à l'aide du test Xpert MRSA/SA SSTI.

Sensibilité analytique

Études de limites de détection

Des études ont été menées pour déterminer l'intervalle de confiance à 95 % pour la limite de détection (LDD) analytique des cellules de *Staphylococcus aureus* (SA) et de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) diluées dans une matrice de blessure simulée d'origine humaine. La matrice de blessure simulée était constituée d'un concentré de globules blancs (GB) préparé par centrifugation à partir de sang entier. La matrice contenait également des globules rouges (GR) et du plasma, ainsi qu'une quantité négligeable d'anticoagulant (CPD ou CPDA-1). La limite de détection est définie comme le nombre le plus bas de bactéries souches par échantillon qui peut être détecté à plusieurs reprises dans des échantillons négatifs avec un niveau de confiance de 95 % ou la concentration la plus basse à laquelle 19 réplicats sur 20 étaient positifs.

Pour le SARM, des réplicats de 20 ont été évalués à chaque concentration de SARM testée (bactéries souches/écouvillon) pour 6 isolats représentant le SCC*mec* de type I, II, III, IVa, V et VI. Une fois caractérisées par électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE), la souche USA100, la plus courante en milieu hospitalier, et la souche USA400, responsable de la plupart des cas communautaires, ont été représentées.

Pour le SA, des réplicats de 20 ont été évalués à chaque concentration de SA (bactéries souches/écouvillon) pour 3 isolats SA. Les types USA900 et USA1200 étaient représentés.

L'estimation et les intervalles de confiance ont été déterminés en utilisant la régression logistique avec des données (nombre de résultats positifs par nombre de réplicats à chaque niveau) sur la gamme des bactéries souches/écouvillon testées. Les intervalles de confiance ont été déterminés en utilisant les estimations de probabilités maximales sur les paramètres du modèle logistique en utilisant la matrice de variance-covariance de grand échantillon. Les estimations du point de LDD et les intervalles de confiance supérieur et inférieur à 95 % pour chaque SA et chaque type SCC*mec* de SARM testés sont résumés aux Tableaux 8 et 9.

Tableau 8. Intervalles de confiance à 95 % pour LDD analytique – SA

ID souche SA	PFGE	LDD (bactéries souches/écouvillon)	IC 95 % inf.	IC 95 % sup.
N7129	USA900	51	42	69
102-04	USA1200	87	76	109
29213	inconnu	123	97	188

Tableau 9. Intervalles de confiance à 95 % pour LDD analytique – SARM

ID souche SARM	SCC*mec* - type	PFGE	LDD (bactéries souches/ écouvillon)	IC 95 % sup.	IC 95 % sup.
64/4176	I	USA500	221	195	271
N315	II	USA100	122	106	152
11373	III	inconnu	124	115	155
MW2	IVa	USA400	82	68	113
ST59-MRSA-V	V	USA1000	242	208	305
HDE288	VI	USA800	183	161	223

Les résultats de cette étude indiquent que le test Xpert MRSA/SA SSTI produit des résultats positifs au SA dans 95 % des cas avec un niveau de confiance de 95 % pour un écouvillon de plaie comportant 150 bactéries souches et un résultat positif au SARM dans 95 % des cas avec un niveau de confiance de 95 % pour un écouvillon de plaie comportant 300 bactéries souches.

Cent vingt-et-un (121) souches supplémentaires de *Staphylococcus aureus* ont été testées à l'aide du test Xpert MRSA/SA SSTI. Des cultures de 18 heures ont été réalisées dans un milieu d'infusion cœur-cervelle (BHI) et ajustées à 0,5 unité McFarland. Toutes les souches ont été testées en trois exemplaires, en utilisant 100 µl de cultures diluées 100 000 à un million de fois.

Les souches SARM (78) et SA (43) ont été sélectionnées de manière à représenter toute la diversité génétique de l'espèce *Staphylococcus aureus*, sur base de leur structure phylogénétique. Les sélections représentent les lignées principales, avec un accent sur les complexes clonaux spécifiques dans lesquels le SARM est fréquemment observé. Des lignées contenant des SARM et des SA, ainsi que des SA exclusivement, ont été incluses.

Le test Xpert MRSA/SA SSTI a correctement identifié 116 souches sur 121. Les 5 échantillons discordants ont été caractérisés par la catalase, la coagulase en tube et la coloration de Gram. La résistance à l'oxacilline liée au gène *MecA* a été évaluée par diffusion de disque en utilisant un disque de céfoxitine de 30 µg et une limite de diamètre de 21/22 mm.

Trois (3) des 78 souches de SARM ont obtenu des résultats négatifs au SARM/positifs au SA à l'aide du test Xpert MRSA/SA SSTI. Une caractérisation supplémentaire indique que ces souches ne sont pas résistantes et ont été correctement rapportées comme négatives au SARM et positives au SA.

Deux (2) des 43 souches de SA ont obtenu des résultats positifs au SARM/positifs au SA à l'aide du test Xpert MRSA/SA SSTI. Une caractérisation supplémentaire indique que ces souches sont résistantes et ont été correctement rapportées comme positives au SARM et positives au SA.

Chacun des 12 isolats USA300 connus a été correctement rapporté comme positif au SARM et au SA, comme prévu.

Évaluation des variantes à cassette vide

Vingt-deux (22) isolats de *Staphylococcus aureus* identifiés comme « variantes à cassette vide » ont été testées à l'aide du test Xpert MRSA/SA SSTI. Des cultures de 18 heures ont été ajustées à 0,5 unité McFarland. Toutes les souches ont été testées à partir de cultures diluées 100 fois (élevées) et 100 000 fois (faibles).

Le test Xpert MRSA/SA SSTI a correctement identifié les 22 isolats comme négatifs au SARM et positifs au SA. Aux deux concentrations cellulaires testées, seuls les Ct des cibles *spa* and SCC*mec* ont été rapportés. Aucun Ct de *mecA* n'a été rapporté.

Étude de contamination (carry-over)

Une étude a été menée pour démontrer que les cartouches GeneXpert indépendantes à usage unique empêchent la contamination (carry-over) des échantillons négatifs analysés après des échantillons positifs à très haute concentration dans le même module GeneXpert. L'étude consistait à analyser un échantillon négatif dans un même module GeneXpert, juste après un échantillon positif à très haute concentration en SARM (environ 10^7 bactéries souches/test). L'opération a été répétée 20 fois entre 2 modules GeneXpert, pour un total de 42 expériences. Aucune preuve de contamination (carry-over) n'a été trouvée. Les 21 échantillons positifs ont été correctement rapportés comme positifs au SARM/positifs au SA. Les 21 échantillons négatifs ont été correctement rapportés comme négatifs au SARM/négatifs au SA.

Reproductibilité

Une série de 10 échantillons présentant des concentrations variables de SA, de SARM et de *Staphylococcus epidermidis* (négatif) ont été testés en deux exemplaires, pendant 10 jours distincts, sur chacun des trois sites (10 échantillons × 2 fois par jour × 10 jours × 3 sites). Un lot du kit Xpert MRSA/SA a été utilisé sur chacun des 3 sites de test. Les tests Xpert MRSA ont été réalisés conformément à la procédure de test Xpert MRSA/SA SSTI.

Tableau 10. Résumé des résultats de reproductibilité.

ID de l'échantillon	Site 1	Site 2	Site 3	Accord total
Nég (SERM)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (60/60)
Nég. élevé SA	100 % (20/20)	100 % (20/20)	90 % (18/20)	96,7 % (58/60)
Pos. faible SA	100 % (20/20)	100 % (20/20)	95 % (19/20)	98,3 % (59/60)
Nég. élevé SARM1	100 % (20/20)	90 % (18/20)	100 % (20/20)	96,6 % (58/60)
Pos. faible SARM1	100% (20/20)	100% (20/20)	90% (18/20)	96.6% (58/60)
Nég. élevé SARM2	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Pos. faible SARM2	100% (20/20)	95% (19/20)	95% (19/20)	96.6% (58/60)
% accord total par site	100% (140/140)	97.9% (137/140)	95.7% (134/140)	97.9% (411/420)

Tableau 11. Résumé des résultats de valeur Ct par sonde et niveau d'échantillon

CTE			
Niveau	**Moyenne**	**Écart type**	**% CV**
Nég. élevé SARM1	34,52	0,82	2,36
Nég. élevé SARM2	34,46	0,85	2,46
Nég (SERM)	34,44	0,90	2,62
Nég. élevé SA	34,38	0,92	2,66
Spa			
Niveau	**Moyenne**	**Écart type**	**% CV**
Pos. faible SARM1	32,96	0,8	2,44
Pos. faible SARM2	31,05	0,69	2,21
Pos. faible SA	33,91	0,8	2,35
mecA			
Niveau	**Moyenne**	**Écart type**	**% CV**
Pos. faible SARM1	33,25	0,80	2,40
Pos. faible SARM2	31,50	0,68	2,16
SCC*mec*			
Niveau	**Moyenne**	**Écart type**	**% CV**
Pos. faible SARM1	34,19	0,90	2,63
Pos. faible SARM2	33,13	0,68	2,05

Une deuxième étude de reproductibilité a été réalisée sur une série de 4 échantillons (SA : 10X LDD, SARM1 : 10X LDD, SARM2 : 10X LDD et témoin négatif : *Staphylococcus epidermidis*). Les séries ont été testées en deux exemplaires pendant 10 jours distincts sur chacun des trois sites (4 échantillons x 2 fois par jour x 10 jours x 3 sites). Un lot du kit du test Xpert MRSA/SA SSTI a été utilisé sur chacun des 3 sites de test. Les tests Xpert MRSA/SA SSTI ont été réalisés conformément à la procédure de test Xpert MRSA/SA SSTI. Des résultats corrects ont été obtenus dans 239 des 240 tests.

Tableau 12. Résumé des résultats de reproductibilité.

ID de l'échantillon	Site 1	Site 2	Site 3	Accord total
Nég (SERM)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (60/60)
Pos[1] modéré SA	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (60/60)
Pos[1] modéré SARM1	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (60/60)
Pos[1] modéré SARM2	100 % (20/20)	100 % (20/20)	95 % (19/20)	98,3 % (59/60)
% accord total par site	100 % (80/80)	100 % (80/80)	98,8 % (79/80)	99,6 % (239/240)

[1] 10X LDD

Tableau 13. Résumé des résultats de valeur Ct par sonde et niveau d'échantillon

CTE			
Niveau	**Moyenne**	**Écart type**	**% CV**
Pos. modéré SARM1	35,72	1,87	5,24
Pos. modéré SARM2	36,29	2,66	7,34
Pos. modéré SA	34,55	1,19	3,44
NÉG	34,45	1,06	3,09
Spa			
Niveau	**Moyenne**	**Écart type**	**% CV**
Pos. modéré SARM1	29,52	1,30	4,40
Pos. modéré SARM2	28,91	1,03	3,57
Pos. modéré SA	30,59	0,91	2,99
mecA			
Niveau	**Moyenne**	**Écart type**	**% CV**
Pos. modéré SARM1	29,78	1,28	4,29
Pos. modéré SARM2	29,32	1,24	4,22
SCC*mec*			
Niveau	**Moyenne**	**Écart type**	**% CV**
Pos. modéré SARM1	31,49	1,26	3,99
Pos. modéré SARM2	31,05	1,12	3,59

Références

1. Bannerman TL. 2003 Chapter 28: Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci that Grow Aerobically. Manual of clinical microbiology, 8e éd. ASM Press Washington, DC. Pages 384-404.
2. Mainous AG, Hueston WJ, Everett, et al. 2006. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *S aureus* in the United States, 2001-2002. An Family Medicine. 4(2):132-137.
3. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. Am J Infect Control 2004;32:470-85.
4. Chaix C, Durand-Zileski I, Alberti C, Buisson B. 1999. Control of Endemic Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. JAMA 282(19):1745-51.
5. Shopsin B, Kreiswirth BN. 2001. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Emerging Infectious Diseases 7(2) 323-6.
6. Salgado CD et al. 2003. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Meta-analysis of Prevalence and Risk Factors. CID 36:131.
7. Donnio, P-Y, Février F, Bifani P, et al. 2007. Molecular and epidemiological evidence for the spread of multiresistant methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains in hospitals. Antimicrobial. Agents Chemother. 51: 4342 – 4350.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). HHS Publication number (CDC) 93-8395.

9. Clinical and Laboratory Standards Institute (anciennement National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (refer to latest edition).

10. Ewig S, Schlochtermeier M, Göke N, et al. 2002. Applying sputum as a diagnostic tool in pneumonia: limited yield, minimal impact on treatment decisions. Chest. 121:1486-1492.

11. RG Dotson and SK Pingleton. 1993. The effect of antibiotic therapy on recovery of intracellular bacteria from bronchoalveolar lavage in suspected ventilator-associated nosocomial pneumonia. Chest. 103, 541-546.

12. Souweine B, Veber B, Bedos JP, et al. 1998. Diagnostic accuracy of protected specimen brush and bronchoalveolar lavage in nosocomial pneumonia: impact of previous antimicrobial treatments. Crit Care Med. Feb;26(2):236-244.

13. Kanegaye JT, Soliemanzadeh P, Bradley JS, et al. 2001. Lumbar puncture in pediatric bacterial meningitis: defining the time interval for recovery of cerebrospinal fluid pathogens after parenteral antibiotic pretreatment. Pediatrics. 108(5):1169-1174.

14. Brook I, Gober A. 2005. Effects of amoxicillin and cefdinir on nasopharyngeal bacterial flora. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. Sep;131:785-787.

15. Nadarajah J, et. al., Identification of different clonal complexes and diverse amino acid substitutions in penicillin-binding protein 2 (PBP2) associated with borderline oxacillin resistance in Canadian *Staphylococcus aureus* isolates. J of Med Micro (2006), 55: 1675-1683.

16. Ribeiro J, et. al., Misclassification of Susceptible Strains of *Staphylococcus aureus* as Methicillin-Resistant *S. aureus* by a rapid Automated Susceptibility Testing System. (1999), 37: 1619-1620.

Assistance

Pour bénéficier d'une assistance, contactez Cepheid en utilisant l'une des informations relatives aux contacts suivantes. Assurez-vous de communiquer le numéro de série de l'appareil et le numéro d'ID du lot de réactifs lorsque vous appelez ou envoyez un courrier électronique.

Union européenne

Pour bénéficier d'une assistance technique, utilisez les informations de contact suivantes :

Tél. : +33.563.82.53.19

Courrier électronique : techsupport@cepheideurope.fr

Autres sites

Contactez votre représentant local Cepheid.

Tableau des symboles

Symbole	Signification
REF	Référence
IVD	Appareil à usage médical de diagnostic *in vitro*
	À ne pas réutiliser
LOT	Code du lot
	Attention, consultez le document d'accompagnement
	Fabricant
	Contenu suffisant pour <n> tests
	Date limite d'utilisation
CONTROL	Contrôle
EC REP	Mandataire agréé pour la Communauté européenne
CE	Marquage CE – Conformité européenne
	Limitation de la température
	Risques biologiques

Cepheid AB
Röntgenvägen 5
SE-171 54 Solna
Suède

Produit de Suède

EC REP

Cepheid Europe
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

Tél. : +33.563.82.53.00
Fax : +33.563.82.53.01
Courrier électronique : cepheid@cepheideurope.fr

CE IVD

Deutsch

Nur zur Verwendung in der *In-vitro*-Diagnostik

Markenname

Xpert® MRSA/SA SSTI

Üblicher Name

MRSA/SA SSTI-Test

Verwendungszweck

Beim Cepheid Xpert MRSA/SA-Test von Haut- und Weichgewebeinfektionen (Xpert MRSA/SA SSTI Assay), der mit dem GeneXpert® Dx-System ausgeführt wird, handelt es sich um einen qualitativen *In-vitro*-Diagnostiktest zum Nachweis des *Staphylococcus aureus* (SA) und des Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) aus Haut- und Weichgewebeinfektions-Abstrichen. Der Test verwendet die Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis der MRSA/SA-DNA. Die Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung ist in Kombination mit anderen Labortests wie z. B. mikrobiologischen Kulturen und mit klinischen Daten, die dem Kliniker zur Verfügung stehen, als Hilfsmittel zum Nachweis von MRSA/SA aus Haut- und Weichgewebeinfektionen einzusetzen. Die Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung ist nicht zur Überwachung der Behandlung von MRSA/SA-Infektionen vorgesehen. Begleitkulturen sind im Falle von SA und MRSA erforderlich, um Organismen für Resistenztestung oder epidemiologische Untersuchungen zu gewinnen.

Zusammenfassung und Erklärung

Staphylococcus aureus (SA) ist ein gut dokumentierter humaner opportunistischer und ein verbreiteter nosokomialer Krankheitserreger, der eine Reihe von Erkrankungen hervorruft. Zu diesen Erkrankungen gehören Haut- und Weichgewebeinfektionen wie Karbunkel und Furunkel sowie postoperative Wundinfektionen an verschiedenen Stellen. Als nosokomialer Krankheitserreger stellt *S. aureus* eine wesentliche Morbiditäts- und Mortalitätsursache dar. Infektionen mit *S. aureus* sind häufig akut und pyogen und können sich, wenn sie unbehandelt bleiben, auf das umgebende Gewebe oder durch Bakteremie auf metastatische (andere Organe betreffende) Stellen ausbreiten. Zu den ernsteren, durch *S. aureus* hervorgerufenen Infektionen gehören Bakteremie, Pneumonie, Osteomyelitis, akute Endokarditis, toxisches Schocksyndrom, Lebensmittelvergiftung, Myokarditis, Pericarditis, Enzephalitis, Meningitis, Chorioamnionitis, toxische epidermale Nekrolyse und Abszesse an Muskeln, Urogenitaltrakt, Zentralnervensystem und verschiedenen Intraabdominalorganen[1].

In den frühen 50er Jahren begann Penicillin durch die Übertragung und Verbreitung von Beta-Laktamase-produzierenden Plasmiden für die Behandlung von *S. aureus*-Infektionen seine Wirkung zu verlieren. 1959 wurde das synthetische Penicillin Methicillin auf den Markt gebracht. Jedoch wurden schon 1960 Methicillin-resistente *S. aureus*-Stämme (MRSA) nachgewiesen. Als Ursache konnte die Übertragung des *mecA*-Gens auf *S. aureus* ermittelt werden. In den USA ist MRSA heutzutage für rund 25 % der nosokomialen Infektionen verantwortlich. Berichte über ambulant erworbene MRSA-Infektionen, die zu einer Erhöhung der Krankheitsziffern und Sterblichkeit führen, nehmen zu. Die Mortalitätsraten, die der MRSA-Bakteremie und der Bakteremie durch die Methicillin-empfindliche Variante von *S. aureus* (SA) zugeschrieben werden, belaufen sich auf 33 bzw. auf 16 %. Auch die steigenden Kosten von MRSA-Infektionen sind besorgniserregend. In Einrichtungen des Gesundheitswesens wird daher durch die Umsetzung von Kontrollstrategien und -regeln versucht, die weitere Verbreitung dieser Infektionen einzudämmen. Die Kontrolle von MRSA-Infektionen ist einer der Hauptschwerpunkte in Programmen gegen Krankenhausinfektionen. Zurzeit ist die Ansetzung von Kulturen die Standardmethode zum Nachweis von MRSA und SA. Bei dieser sehr arbeitsaufwendigen Methode kann es allerdings mehrere Tage dauern, bis ein definitives Ergebnis vorliegt.[2,3,4,5,6,7]

Prinzipien der Prozedur

Das GeneXpert Dx-System automatisiert und integriert die Probenvorbereitung, die Amplifizierung von Nukleinsäuren und die Detektion der Zielsequenz aus einfachen und komplexen Proben mittels Echtzeit-PCR-Tests. Das System besteht aus einem Instrument und einem PC mit vorinstallierter Software, die zur Ausführung von Tests und zur Anzeige der Ergebnisse dient. Das System sieht die Verwendung von Einweg-Testkartuschen vor, die die PCR-Reagenzien enthalten und in denen der PCR-Prozess abläuft. Da die Testkartuschen in sich abgeschlossen sind, werden Kreuzkontaminationen minimiert. Eine vollständige Beschreibung des Systems ist im *Benutzerhandbuch zum GeneXpert Dx-System* zu finden.

Der Xpert MRSA/SA SSTI-Test beinhaltet Reagenzien zum Nachweis von MRSA und SA sowie eine Probenverarbeitungskontrolle (SPC) zur Sicherstellung der korrekten Verarbeitung der Zielbakterien und Überprüfung, ob Inhibitoren in der PCR-Reaktion vorhanden sind. Die Probenverarbeitungskontrolle stellt auch sicher, dass die PCR-Reaktionsbedingungen (Temperatur und Zeit) für die Amplifikationsreaktion korrekt und die PCR-Reagenzien funktionstüchtig sind. Mit der Sondenprüfungsfunktion (PCC) werden die Rehydrierung der Reagenzien, die Befüllung des PCR-Gefäßes in der Testkartusche, die Sondenintegrität und die Farbstabilität überprüft.

Mit den Primern und Sonden des Xpert MRSA/SA SSTI-Tests lassen sich Sequenzen nachweisen, die dem Staphylokokkenprotein A (*spa*), dem Gen für die Methicillin-Resistenz (*mecA*) und der in die SA-Chromosomenstelle *attB* eingefügten Staphylokokken-Genkassette (SCC*mec*) eigen sind.

Reagenzien und Instrumente

Im Lieferumfang enthaltenes Material

Das Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchungs-Kit enthält Reagenzien zur Verarbeitung von 10 Proben oder Qualitätskontrollproben. Das Kit enthält Folgendes:

Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchungs-Testkartusche mit integrierten Reaktionsgefäßen	**10**
Kügelchen 1 , 2 und 3 (gefriergetrocknet)	**1 pro Kartusche**
MRSA/SA SSTI-Untersuchungsreagenz 1	**2,8 ml pro Kartusche**
Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchungsreagenz 2	**3,2 ml pro Kartusche**
Xpert MRSA/SA SSTI Elutionsreagenz	**10**
Elutionsreagenz (Guanidiniumthiocyanat)	**1 x 2,0 ml pro Beutel**
CD	**1 pro set**
Untersuchungsdefinitionsdateien (ADF)	
Anweisungen an die ADF in die Software GX importieren	
Packungsbeilage	

Hinweis:

- Sicherheitsdatenblätter (SDS, Safety Data Sheets) sind auf den Webseiten www.cepheid.com/tests-and-reagents/literature/msds oder www.cepheidinternational.com/tests-and-reagents/literature/msds erhältlich.
- Das BSA (Rinderserumalbumin) in den Kügelchen in diesem Produkt wurde ausschließlich aus bovinem Plasma hergestellt, das aus den USA stammt. Auch die Herstellung des BSA erfolgte in den USA. Die Tiere erhielten keinerlei Wiederkäuer- oder anderes Tierprotein mit dem Futter und wurden ante- und post-mortem Tests unterzogen. Bei der Verarbeitung wurde das Material nicht mit anderen Tiermaterialien vermischt.

Lagerung und Handhabung

- Die Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchungs-Testkartuschen und -Reagenzien bei 2 – 28 °C lagern.
- Reagenzien und Testkartuschen, die das Verfallsdatum überschritten haben, dürfen nicht verwendet werden.
- Testkartuschen dürfen erst unmittelbar vor Testdurchführung geöffnet werden.
- Kartusche und Reagenzien innerhalb von 30 Minuten nach dem Öffnen des Deckels der Kartusche verwenden.
- Keine trüben oder verfärbt Reagenzien verwenden.

Materialien, die nicht im Lieferumfang enthalten sind

- Das GeneXpert Dx-System (die Katalognummer hängt von der Konfiguration ab). GeneXpert-Instrument, Computer, Barcode-Lesegerät und Benutzerhandbuch
- Drucker (Kompatibilitätshinweise finden Sie im *Benutzerhandbuch zum GeneXpert Dx-System*.)
- Cepheid Abstrichtupfer (900-0370) oder entsprechendes Copan-Produkt
- Vortex-Mixer
- Einweg-Übertragungspipetten
- Sterile Gaze

Erhältliche Materialien, die nicht im Lieferumfang enthalten sind

KWIK-STIKs™ von MicroBiologics Bestellnr. 0158MRSA und Bestellnr. 0360SA als Positivkontrollen und Bestellnr. 0371MSSE (Methicillin-sensitiver *Staphylococcus epidermidis*) als Negativkontrolle.

Warnungen und Vorsichtshinweise

- Alle biologischen Patientenproben und auch die gebrauchten Kartuschen sind als potenziell infektiös zu behandeln. Da es oft unmöglich ist, potenziell infektiöse Patientenproben zu erkennen, sind alle biologischen Patientenproben gemäß den üblichen Vorsichtsmaßnahmen zu behandeln. Die Richtlinien zum Umgang mit Proben sind bei der US-amerikanischen CDC (Center for Disease Control and Prevention[8], US-amerikanische staatliche Behörde für den Schutz der Bevölkerung vor Krankheiten und Seuchen) und beim Clinical and Laboratory Standards Institute (US-amerikanisches Institut für Standards in Klinik und Labor; früher National Committee for Clinical Laboratory Standards)[9] erhältlich.

  In Mischkulturen aus MRSA/SA und anderen Organismen (z. B. Gram-negative Bazillen, Hefe) können die Ergebnisse je nach der vorhandenen MRSA/SA-Konzentration falsch negativ oder variabel sein, besonders wenn die MRSA/SA-Konzentration in der Nähe der Nachweisgrenze der Untersuchung liegt.

- Es sind die Sicherheitsprozeduren der jeweiligen Institution für den Umgang mit Chemikalien und die Handhabung von biologischen Proben zu beachten.
- Die Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung kann MRSA- und/oder SA-DNA aus nicht lebenden Organismen anzeigen. Die Wahrscheinlichkeit eines solchen Falls steigt bei Patienten, die mit Antibiotika behandelt werden.
- Die Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung liefert keine Testergebnisse im Hinblick auf die antimikrobielle Resistenztestung. Es ist zusätzliche Zeit erforderlich, um Kulturen anzusetzen und eine Resistenztestung durchzuführen.
- Keine Reagenzien des Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung durch andere Reagenzien ersetzen.
- Der Deckel der Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung-Kartusche darf nur für die Zugabe von Probe und Reagenzien und bei der Durchführung von Wiederholungstests geöffnet werden.
- Keine Kartuschen verwenden, die nach der Zugabe von Probe und Reagens fallen gelassen oder geschüttelt wurden.
- Kartuschen mit beschädigtem Reaktionsgefäß dürfen nicht verwendet werden.
- Jede Einweg-Xpert MRSA/SA SSTI-Testkartusche dient zur Durchführung eines einzigen Tests. Gebrauchte Testkartuschen nicht erneut verwenden.
- Für eine ordnungsgemäße Entsorgung gebrauchter Probenkartuschen und nicht verwendeter Reagenzien fragen Sie bitte den Umweltbeauftragten Ihrer Einrichtung. Dieses Material kann nach dem föderalen EPA Resource conservation and Recovery Act (RCRA) Eigenschaften von Sondermüll besitzen, der besondere Entsorgungsbedingungen vorschreibt.Einrichtungen außerhalb der USA müssen ihre länderspezifischen Entsorgungsbedingungen für Sondermüll konsultieren. Prüfen Sie bitte auch die regionalen und Ländervorschriften, da diese von den Entsorgungsvorschriften des Bundes abweichen können.
- Das Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchungs-Kit bei 2 – 28 ˚C lagern.
- Öffnen Sie den Deckel der Kartusche erst, wenn Sie bereit sind, die Testung durchzuführen.
- Das Elutionsreagens enthält Guanidininthiocyanat (H402, EUH301), das für aquatisches Leben schädlich ist und bei Berührung giftige Gase entwickelt.
- Reagens 2 enthält Natriumhydroxid; (H314), das ätzend auf Augen und Haut wirkt. Augen- und Hautschutz ist erforderlich.

Probenentnahme, Transport und Lagerung

Abstrichproben von Haut- und Weichgewebeinfektionen können mit dem Cepheid Abstrichtupfer gemäß den in der anwendenden Institution üblichen Standardverfahren entnommen werden. Die Abstrichproben werden wieder in das Plastiktransportröhrchen gelegt (flüssiges Medium, Cepheid Abstrichtupfer oder Copan-Produkt empfohlen), bei Raumtemperatur gelagert und zur Verarbeitung innerhalb des nächsten Tages dorthin gesendet, wo der GeneXpert-Test durchgeführt werden soll. Der verbleibende, nicht getestete Abstrich ist für eine mikrobiologische Kultur in entsprechende Transportsysteme zu legen und innerhalb von 4 Tagen zu züchten. Wenn die Probe nicht bis zum nächsten Tag abgeschickt wird, sollte sie auf Eis transportiert werden. Alternativ können Abstrichtupfer auch bis zu 5 Tage lang bei 2-8 ˚C für Tests gelagert werden.

Mikrobiologische Kultur

Die Methoden zum Züchten von SSTI-Kulturen richten sich nach den üblichen aktuellen Laborstandardvorgehensweisen. Zum Züchten von Kulturen sind verbleibende nicht getestete Abstrichproben in entsprechende Transportsysteme zu legen und innerhalb von 4 Tage zu züchten.

Prozedur

Vorbereiten der Testkartusche

Wichtig: Den Test innerhalb von 15 Minuten nach Hinzufügen der Reagenzien zur Testkartusche beginnen.

Zugabe von Probe und Reagenzien in die Kartusche:

1. Kartusche und Reagens aus der Verpackung nehmen.
2. Den Abstrichtupfer aus dem Transportbehälter nehmen.

Hinweis: Zur Minimierung des Kontaminationsrisikos bei der Handhabung des Abstrichtupfers sterile Gaze verwenden.

3. Den Tupfer in das Röhrchen mit dem Elutionsreagenz einführen und abbrechen.
4. Den Deckel das Elutionsreagenzfläschchen schrauben aufsetzen und bei hoher Geschwindigkeit 10 Sekunden lang vortexen.
5. Kartuschendeckel öffnen. Mit einer sterilen Übertragungspipette den gesamten Inhalt des Elutionsreagenz in die Kammer „S“ der Xpert MRSA/SA SSTI-Testkartusche geben.
6. Den Kartuschendeckel schließen.

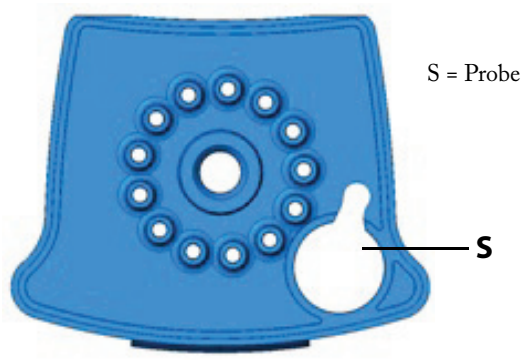

Abbildung 1. Xpert MRSA/SA SSTI-Testkartusche (Draufsicht)

Testbeginn

Wichtig: Vor Beginn des Tests ist sicherzustellen, dass die Definition der Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung in die Software importiert wurde.

In diesem Abschnitt werden die Grundschritte der Testausführung beschrieben. Für genauere Anweisungen das *Benutzerhandbuch zum GeneXpert Dx-System* verwenden.

1. Schalten Sie das GeneXpert Dx System ein und anschließend den Computer. Die GeneXpert Software startet automatisch.
2. Mit Ihrem Benutzernamen und Kennwort bei der GeneXpert Dx-Systemsoftware anmelden.
3. Im Fenster **GeneXpert Dx System** auf **Create Test** (**Test erstellen**) klicken. Daraufhin wird das Dialogfeld zum **Scan Cartridge Barcode (Scannen des Kartuschen-Barcodes**) angezeigt.
4. Den Barcode auf der Xpert MRSA/SA SSTI-Testkartusche einscannen. Das Fenster **Create Test** (**Test erstellen**) wird geöffnet. Mithilfe der Barcode-Informationen gibt die Software automatisch die Daten in die folgenden Felder ein: Select Assay (Untersuchung auswählen), Reagent Lot ID (Reagenzienchargen-ID), Cartridge SN (Testkartuschen-SN) und Expiration Date (Verfallsdatum).
5. Die **Sample ID** (**Proben-ID**) in das Feld einscannen oder -tippen. Auf die Eingabe der korrekten Proben-ID achten. Die Proben-ID hängt mit den Testergebnissen zusammen und wird im Fenster **View Results** (**Ergebnisse anzeigen**) und in allen Berichten angezeigt.
6. Auf **Start Test** (**Test starten**) klicken. Kennwort in das angezeigte Dialogfeld eingeben.
7. Die Tür des Instrumentenmoduls mit der grün blinkenden Anzeige öffnen und die Kartusche laden.
8. Die Tür schließen. Der Test beginnt und die grüne Anzeige hört auf zu blinken. Wenn der Test abgeschlossen ist, geht die Lampe aus.
9. Die Modultür kann erst geöffnet und die Kartusche entnommen werden, wenn das System die Tür entriegelt hat.

10. Die gebrauchten Kartuschen sind gemäß den Standardverfahren Ihrer Institution in entsprechenden Probenabfallbehältern zu entsorgen.

Anzeigen und Drucken der Ergebnisse

Siehe das *Benutzerhandbuch zum GeneXpert Dx-System* für genaue Informationen zum Anzeigen und Drucken der Ergebnisse.

CONTROL

Qualitätskontrolle

Integrierte Qualitätskontrollen

Zu jedem Test gehören eine Probenverarbeitungskontrolle (SPC oder BG3 im Fenster mit der Ergebnisanzeige für Benutzer mit Administratorrechten) und eine Sondenprüfungskontrolle (PCC).

- **Probenverarbeitungskontrolle (SPC)**: Stellt sicher, dass die Probe ordnungsgemäß verarbeitet wurde. Die SPC enthält Sporen des *Bacillus globigii* in Form getrockneter Sporen, der in jeder Kartusche enthalten ist, um eine angemessene Verarbeitung der Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchungsprobe sicherzustellen. Bei der SPC wird überprüft, ob die Lyse der *Staphylococcus aureus* Bakterien durchgeführt wurde, sofern Organismen vorhanden sind, und ob die Probe ordnungsgemäß verarbeitet wurde. Ferner wird mit dieser Kontrolle auch eine mit der Probe in Zusammenhang stehende Inhibition der Echtzeit-PCR-Untersuchung nachgewiesen und sichergestellt, dass die PCR-Reaktionsbedingungen (Temperatur und Zeit) für die Amplifikationsreaktion korrekt und die PCR-Reagenzien funktionstüchtig sind. In einer negativen Probe sollte die SPC positiv sein; in einer positiven Probe kann sie negativ oder positiv sein. Die SPC gilt als bestanden, wenn sie die vorbestimmten Akzeptanzkriterien erfüllt.
- **Sondenprüfungskontrolle (PCC)**: Vor Beginn der PCR-Reaktion misst das GeneXpert Dx-System das Fluoreszenzsignal aus den Sonden, um die Rehydrierung der Reagenzkügelchen, die Befüllung des Reaktionsgefäßes, die Sondenintegrität und die Farbstabilität zu überwachen. Der Sondentest gilt als bestanden, wenn er die vorbestimmten Akzeptanzkriterien erfüllt.

Externe Kontrollen

- KWIK-STIKs (MicroBioLogics, Bestellnr. 0158MRSA [SCC*mec*-type II] und Bestellnr. 0360SA, als Positivkontrollen und Bestellnr. 0371MSSE als Negativkontrolle) können für Schulungszwecke, Fähigkeitstests und zur externen QK des GeneXpert Dx Systems eingesetzt werden. MRSA-Stämme, die andere SCC*mec*-Typen darstellen, können gegebenenfalls als zusätzliche externe Positivkontrollen zur Überwachung von Untersuchungs-Primern und -Sonden eingesetzt werden, die in der Untersuchung nicht direkt kontrolliert werden. Externe Kontrollen können gegebenenfalls nach Maßgabe anerkannter Institutionen und behördlicher Vorschriften verwendet werden. Es sind die weiter unten beschriebenen externen MicroBioLogics-Kontrollverfahren anzuwenden:
  1. Den Beutel am Einschnitt aufreißen und den KWIK-STIK entnehmen.
  2. Den unteren Teil der Ampulle in den Deckel drücken, um das hydrierende Fluid freizusetzen.
  3. Vertikal halten und punktieren, um den Flüssigkeits-Flow durch den Schaft in den unteren Bereich des Geräts mit den Kügelchen zu erleichtern.
  4. Um die Auflösung des lyophilisierten Zellkügelchens zu erleichtern, das Kügelchen zerdrücken und den unteren Kammerbereich vorsichtig zusammendrücken.
  5. Den KWIK-STIK auseinanderziehen, um den Tupfer freizugeben, und den Tupfer in das Röhrchen mit dem Elutionsreagenz (Schraubkappe) einführen.
  6. Der KWIK-STIK-Tupfer ist jetzt für den Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchungstest bereit.
  7. Wenn die externe Qualitätskontrolle nicht erwartungsgemäß verläuft, den externen Kontrolltest wiederholen und/oder Kontakt zu Cepheid wegen Unterstützung aufnehmen.

Beispiele für Ergebnisse des MRSA/SA SSTI-Untersuchung werden in den Abbildungen 2 bis 5 gezeigt.

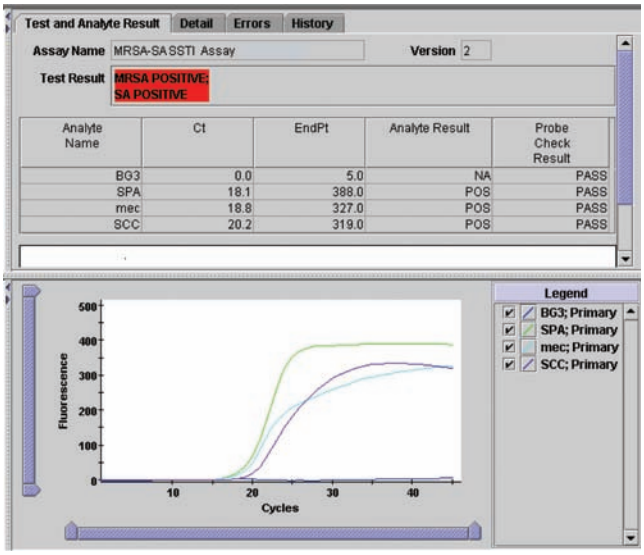

Abbildung 2. Beispiel für das Ergebnis „MRSA positiv/SA positiv“

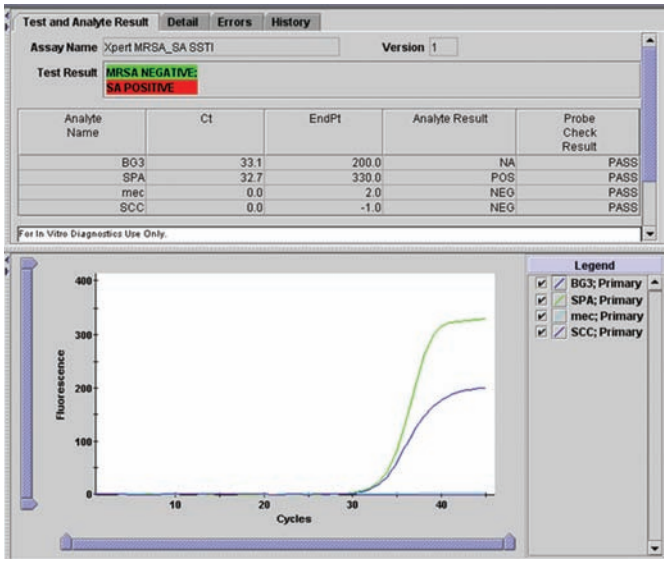

Abbildung 3. Beispiel für das Ergebnis „MRSA negativ/SA positiv“

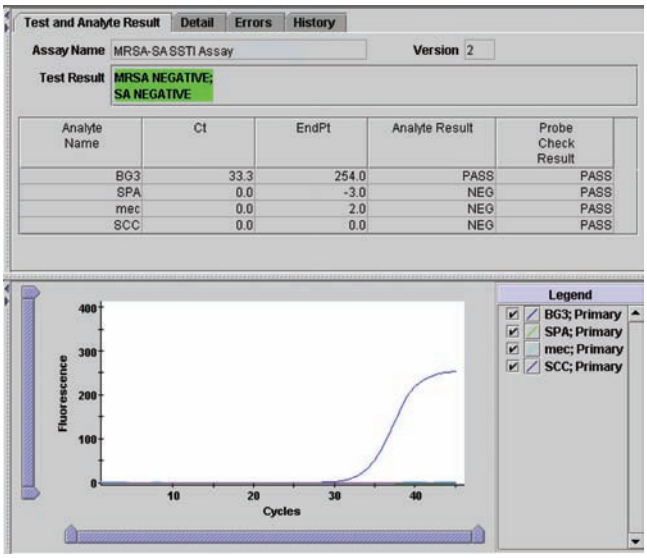
Test and Analyte Result
Detail
Errors
History
Assay Name MRSA-SA SSTI Assay
Version 2
Test Result MRSA NEGATIVE; SA NEGATIVE
Analyte Name | Ct | EndPt | Analyte Result | Probe Check Result
BG3 | 33.3 | 254.0 | PASS | PASS
SPA | 0.0 | -3.0 | NEG | PASS
mec | 0.0 | 2.0 | NEG | PASS
SCC | 0.0 | 0.0 | NEG | PASS
Legend
BG3; Primary
SPA; Primary
mec; Primary
SCC; Primary
Fluorescence
Cycles

Abbildung 4. Beispiel für das Ergebnis „MRSA negativ/SA negativ"

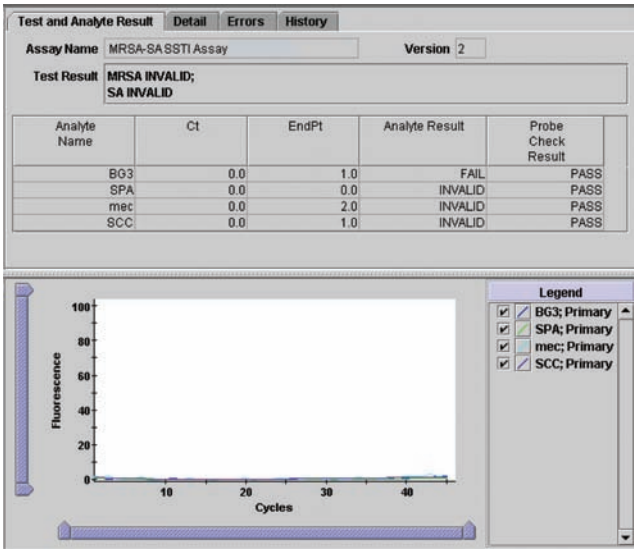
Test and Analyte Result
Detail
Errors
History
Assay Name MRSA-SA SSTI Assay
Version 2
Test Result MRSA INVALID; SA INVALID
Analyte Name | Ct | EndPt | Analyte Result | Probe Check Result
BG3 | 0.0 | 1.0 | FAIL | PASS
SPA | 0.0 | 0.0 | INVALID | PASS
mec | 0.0 | 2.0 | INVALID | PASS
SCC | 0.0 | 1.0 | INVALID | PASS
Legend
BG3; Primary
SPA; Primary
mec; Primary
SCC; Primary
Fluorescence
Cycles

Abbildung 5. Beispiel eines ungültigen Ergebnisses

Interpretation der Ergebnisse

Das GeneXpert Dx-System interpoliert die Ergebnisse aus gemessenen Fluoreszenzsignalen und eingebetteten Berechnungsalgorithmen; die Ergebnisse werden im Fenster **View Results** (**Ergebnisse anzeigen**) angezeigt. Die folgenden Ergebnisse sind möglich:

MRSA POSITIVE/SA POSITIVE (MRSA POSITIV/SA POSITIV)
Die Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung kann MRSA- und/oder SA-DNA aus nicht lebenden Organismen anzeigen.

Es wurden MRSA-DNA-Zielsequenzen nachgewiesen/Es wurden SA-DNA-Zielsequenzen nachgewiesen.

- MRSA POSITIV — Alle MRSA-Ziele (*spa*, *mecA* und SCC*mec*) verfügen über einen Grenzwertzyklus innerhalb des gültigen Bereichs und einen Endpunkt über der Mindesteinstellung.
- SPC — NA (keine Angaben); die SPC wird ignoriert, da die MRSA-Amplifizierung u. U. mit dieser Kontrolle konkurriert.
- Sondenprüfung — PASS (BESTANDEN); alle Sondenprüfungen wurden bestanden.

MRSA NEGATIVE/SA POSITIVE (MRSA NEGATIV/SA POSITIV)
Die Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung kann MRSA- und/oder SA-DNA aus nicht lebenden Organismen nachweisen.

- Es wurden keine MRSA-DNA-Zielsequenzen nachgewiesen/Es wurden SA-DNA-Zielsequenzen nachgewiesen.
- SA POSITIV — Das SA-Ziel (*spa*) verfügt über einen Grenzwertzyklus innerhalb des gültigen Bereichs und einen Endpunkt über der Mindesteinstellung. Ziel-DNA für SCC*mec* wurde nicht nachgewiesen, Ziel-DNA für *mecA* wurde möglicherweise nachgewiesen oder nicht, oder Ziel-DNA für SCC*mec* wurde nachgewiesen und Ziel-DNA für *mecA* wurde nicht nachgewiesen („leere Kassette“).
- SPC — NA (keine Angaben); die SPC wird ignoriert, da die SA-Amplifikation u. U. mit dieser Kontrolle konkurriert.
- Sondenprüfung — PASS (BESTANDEN); alle Sondenprüfungen wurden bestanden.

Ein positives Testergebnis weist nicht zwingend auf das Vorhandensein lebensfähiger Organismen hin. Es lässt jedoch vermuten, dass MRSA oder SA vorhanden sind.

MRSA NEGATIVE/SA NEGATIVE (MRSA NEGATIV/SA NEGATIV)
Es wurde keine *Staphylococcus aureus*-DNA-Zielsequenz nachgewiesen. Die SPC erfüllt die Akzeptanzkriterien.

- NEGATIVE — Es wurde keine *Staphylococcus aureus*-Ziel-DNA (*spa*) nachgewiesen. Ziel-DNA für *mecA* wurde möglicherweise nachgewiesen oder nicht, oder Ziel-DNA für SCC*mec* wurde möglicherweise nachgewiesen oder nicht.
- SPC — PASS (BESTANDEN); die SPC verfügt über einen Grenzwert innerhalb des gültigen Bereichs und einen Endpunkt über der Mindesteinstellung des Endpunkts.
- Sondenprüfung — PASS (BESTANDEN); alle Sondenprüfungen wurden bestanden.

Ein Falsch-negatives Ergebnis (Ergebnis „MRSA NEGATIV; SA POSITIV“ anstelle von „MRSA POSITIV; SA POSITIV“) könnte sich ergeben, wenn MRSA und SA in einem MRSA:SA-Verhältnis von $1:1x10^6$ oder größer in der Probe vorliegen.

In klinischen Studien lagen bei 5 von 246 MRSA-positiven Kulturen Mischinfektionen von MRSA und SA vor. Xpert MRSA/SA SSTI identifizierte 3 der 5 Mischinfektionen als MRSA-positiv und 2 der 5 Fälle als SA-positiv/MRSA-negativ.

INVALID (UNGÜLTIG)
Es kann nicht ermittelt werden, ob MRSA/SA-Ziel-DNA-Sequenzen vorhanden sind oder nicht; Test gemäß den Anweisungen im Abschnitt weiter unten wiederholen. Die SPC erfüllt die Akzeptanzkriterien nicht, die Probe wurde nicht ordnungsgemäß verarbeitet oder die PCR war gehemmt.

- INVALID (UNGÜLTIG) — Es kann nicht ermittelt werden, ob *Staphylococcus aureus*-DNA vorhanden ist oder nicht.
- SPC-FAIL (NICHT BESTANDEN) — Das SPC-Zielergebnis ist negativ, der Grenzwert der SPC liegt nicht innerhalb des gültigen Bereichs und der Endpunkt liegt unterhalb der Mindesteinstellung.
- Sondenprüfung — PASS (BESTANDEN); alle Sondenprüfungen wurden bestanden.

ERROR (FEHLER)
Es kann nicht ermittelt werden, ob MRSA/SA-Ziel-DNA-Sequenzen vorhanden sind oder nicht; Test gemäß den Anweisungen im Abschnitt weiter unten wiederholen. Der Sondentest ist wahrscheinlich bedingt dadurch fehlgeschlagen, dass das Reaktionsgefäß unsachgemäß befüllt wurde, oder dadurch, dass der Maximaldruck überschritten wurde.

- MRSA — NO RESULT (KEIN ERGEBNIS)
- SA — NO RESULT (KEIN ERGEBNIS)
- SPC — NO RESULT (KEIN ERGEBNIS)
- Sondenprüfung — FAIL (NICHT BESTANDEN)*; mindestens eine Sonde hat die Prüfung nicht bestanden.

* Wenn der Sondentest bestanden wurde, wurde der Fehler durch den Ausfall einer Systemkomponente verursacht.

NO RESULT (KEIN ERGEBNIS)
Es kann nicht ermittelt werden, ob MRSA/SA-Ziel-DNA-Sequenzen vorhanden sind oder nicht; Test gemäß den Anweisungen im Abschnitt weiter unten wiederholen. Die erfassten Daten reichen für ein Testergebnis nicht aus. Das ist beispielsweise der Fall, wenn der Bediener den Test abgebrochen hat, bevor er abgeschlossen war.

- MRSA — NO RESULT (KEIN ERGEBNIS)
- SA — NO RESULT (KEIN ERGEBNIS)
- SPC — NO RESULT (KEIN ERGEBNIS)
- Sondenprüfung — NA (keine Angaben)

Gründe für eine Wiederholung des Tests

Den Test mit einer neuen Kartusche (Gebrauchte Kartuschen nicht erneut verwenden) und neuen Reagenzien wiederholen. Der Wiederholungstest ist innerhalb von 3 Stunden nach Erhalt des unbestimmten Ergebnisses durchzuführen.

Das Ergebnis INVALID (UNGÜLTIG) weist darauf hin, dass die SPC-Kontrolle fehlgeschlagen ist. Die Probe wurde nicht ordnungsgemäß verarbeitet oder die PCR war gehemmt.

Das Ergebnis ERROR (FEHLER) weist darauf hin, dass die Sondenprüfungskontrolle fehlgeschlagen ist und dass der Test abgebrochen wurde, und zwar wahrscheinlich bedingt dadurch, dass das Reaktionsgefäß unsachgemäß befüllt, ein Problem mit der Sondenintegrität festgestellt oder der Maximaldruck überschritten wurde.

Das Ergebnis NO RESULT (KEIN ERGEBNIS) weist darauf hin, dass nicht genügend Daten erfasst wurden. Beispielsweise hat der Bediener den Test abgebrochen, bevor er abgeschlossen war.

Wenn eine externe Qualitätskontrolle nicht erwartungsgemäß verläuft, den externen Kontrolltest wiederholen und/oder Kontakt zu Cepheid wegen Unterstützung aufnehmen.

So führen Sie einen Wiederholungstest durch:

Wenn der Wiederholungstest innerhalb von 3 Stunden nach einem unbestimmten Ergebnis durchgeführt wird*:

1. Den restlichen Inhalt mit einer Einweg-Übertragungspipette aus Kammer „S“ in ein neues Elutionsreagenz übertragen.
2. Vortexen und den gesamten Inhalt des Elutionsreagenz zu Kammer „S“ der neuen MRSA/SA-SSTI-Testkartusche hinzufügen.
3. Den Deckel schließen und den Wiederholungstest starten.

* Wenn der Wiederholungstest nicht innerhalb von 3 Stunden durchgeführt werden kann, eine neue Probe verwenden.

Einschränkungen

Die Leistung der Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung wurde nur anhand der Prozeduren geprüft, die in der Packungsbeilage beschrieben sind. Änderungen an diesen Prozeduren können die Leistung des Tests beeinträchtigen. Ergebnisse der Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung sollten unter Berücksichtigung anderer Klinik- und Labordaten interpretiert werden, die dem Kliniker zur Verfügung stehen.

Die Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung kann MRSA- und/oder SA-DNA aus nicht lebenden Organismen anzeigen. Die Wahrscheinlichkeit eines solchen Falls steigt bei Patienten, die mit Antibiotika behandelt werden. In der maßgeblichen klinischen Studie lag der Anteil falsch positiver Ergebnisse (im Verhältnis zum Kulturverfahren) beim Nachweis von SA in Patienten, die innerhalb von 3 Wochen vor dem Xpert MRSA/SA-Test Antibiotika genommen hatten, bei 13,8 %. Der Anteil falsch positiver Ergebnisse (im Verhältnis zum Kulturverfahren) beim Nachweis von MRSA in Patienten, die innerhalb von 3 Wochen vor dem Xpert MRSA/SA-Test Antibiotika genommen hatten, lag bei 9,5 %.

Ein positives Testergebnis weist nicht zwingend auf das Vorhandensein lebensfähiger Organismen hin. Es lässt jedoch vermuten, dass MRSA oder SA vorhanden sind.

Das Testverfahren mit der Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung sollte ergänzend zu anderen verfügbaren Methoden eingesetzt werden.

Fehlerhafte Testergebnisse können auf eine unsachgemäße Probenentnahme, die Nichtbeachtung des empfohlenen Verfahrens zur Probenentnahme, die Handhabung und Lagerung, technisches Versagen, Probenverwechslung oder auf den Umstand zurückzuführen sein, dass die Zahl der Organismen in der Probe durch den Test nicht nachzuweisen ist. Zur Vermeidung fehlerhafter Ergebnisse sind die Anweisungen in dieser Beilage einzuhalten.

Da der Nachweis von MRSA und SA von der Anzahl der Organismen in der Probe abhängig ist, ist die ordnungsgemäße Entnahme, Handhabung und Lagerung der Proben zur Erzielung verlässlicher Ergebnisse unverzichtbar.

Mutationen oder Polymorphismen in Primer- oder Sondenbindungsregionen können sich auf den Nachweis neuer oder unbekannter MRSA-Varianten auswirken, was zu einem falsch-negativen Ergebnis führen kann.

In Proben, die sowohl MRSA als auch SA enthalten, werden die Methicillin-resistenten SA-Organismen mit der Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung unter Umständen nicht nachgewiesen. (In der maßgeblichen klinischen Studie wies die Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung 2 von 5 MRSA-positiven Kulturproben in Fällen mit dokumentierten MRSA/SA-Mischinfektionen nicht nach.)

In Mischkulturen ist die analytische Nachweisgrenze von MRSA variabel, wenn extrem hohe SA-Konzentrationen vorliegen. Eine SA-Konkurrenz wurde bei einem MRSA:SA-Verhältnis von $1:1x10^6$ beobachtet. In klinischen Studien lagen bei 5 von 246 MRSA-positiven Kulturen Mischinfektionen von MRSA und SA vor. Xpert MRSA/SA SSTI identifizierte 3 der 5 Mischinfektionen als MRSA-positiv und 2 der 5 Fälle als SA-positiv/MRSA-negativ.

Eine Inhibition der MRSA/SA SSTI-Untersuchung wurde bei folgenden Substanzen beobachtet: StaphA ⁺Septic (Wundsalbe) (5 % w/v), Hydrocortison (5 % w/v) und antibakterielle Handwaschlösung (5 % w/v).

Proben, die Mercurochrom enthalten, dürfen wegen dessen fluoreszierender Eigenschaften nicht verwendet werden.

Die Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung ergibt ein falsch-positives MRSA-Ergebnis beim Testen von Mischinfektions-SSTI-Proben, die Methicillin-resistenten Koagulase-negativen *Staphylococcus* (MRCNS) und Methicillin-empfindlichen *Staphylococcus aureus* (SA) („leere Kassette“) enthalten.

Iterferierende Substanzen

In der Forschungsstudie zur Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung wurden bei 428 der 848 Proben Blut als Inhaltsstoff und bei 404 Proben andere unspezifische Substanzen als Inhaltsstoffe verzeichnet, die möglicherweise die Untersuchung beeinträchtigen könnten (Zu beachten ist, dass manche Proben mehrere Typen potenzieller Verunreinigungen enthielten). Fishers Exakte-Tests, die an den Daten aus Abstrichtupfern mit und ohne diese potenziell interferienden Substanzen durchgeführt wurden, zeigten, dass deren Vorhandensein die Untersuchungsleistung nicht beeinträchtigte.

In einer nicht-klinischen Studie wurden potenziell interferienden Substanzen, die in klinischen Proben von Haut- und Weichgewebeinfektionen vorhanden sein können, im direkt im Bezug auf die Leistung der Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung geprüft. Zu den potenziell interferienden Substanzen bei Haut- und Weichgewebeinfektionen gehören, ohne darauf beschränkt zu sein: Blut, Eiter, Plasma, topische (antibiotische/antiseptische/schmerzstillende) Salben, Wundreinigungsmittel und Tinkturen. Diese Substanzen werden in Tabelle 1 und 2 mit den getesteten aktiven Inhaltsstoffen und Konzentrationen aufgeführt. Eine Inhibition der MRSA/SA SSTI-Untersuchung wurde bei folgenden Substanzen beobachtet: StaphA ⁺Septic (Wundsalbe) (5 % w/v), Hydrocortison (5 % w/v) und antibakterielle Handwaschlösung (5 % w/v).

Proben, die Mercurochrom enthalten, dürfen wegen dessen fluoreszierender Eigenschaften nicht verwendet werden.

Tabelle 1. Getestete potenziell interferierende Substanzen bei Haut- und Weichgewebeinfektionen (SSTI)

Substanz	Aktiver Inhaltsstoff	Getesteter Prozentsatz
TET Buffer (Kontrolle)	Kontrolle	Kontrolle
Buffy Coat (Wundsurrogat)	Leukozyten (1,5e9/ml)	50 % (v/v)
Vollblut (MRSA/SA-frei)	N/A	50 % (v/v)
Plasma	N/A	50 % (v/v)
Neosporin	400 Einheiten Bacitracin 5.000 Einheiten Polymyxin B 3,5 mg Neomycin	1 % und 5 % (w/v)
StaphA⁺Septic (Wundsalbe)	0,2 % Benzethoniumchlorid, 2,5 % Lidocain HCl	1 % und 5 % (w/v)
Hydrocortison	1 % Hydrocortison	1 % und 5 % (w/v)
Boil-Ease (Furunkelmittel)	20 % Benzocain	1 % und 5 % (w/v)
Jodtinktur	2 % Jod	50 % (v/v)

Tabelle 2. Getestete potenziell interferierende Substanzen bei Haut- und Weichgewebeinfektionen (SSTI)

Substanz	Aktiver Inhaltsstoff	Getesteter Prozentsatz
TET Buffer (Kontrolle)	Kontrolle	Kontrolle
Mupirocin	0,2 % Benzethoniumchlorid, 2,5 % Lidocain HCl	5 % (w/v)
Vollblut (MRSA/SA-frei)	N/A	50 % (v/v)
Kochsalzlösung	0,65 % Natriumchlorid	50 % (v/v)
Antibakterielle Handwaschlösung	62 % Ethylalkohol	1 % und 5 % (w/v)
70 % Isopropanol	70 % Isopropanol	50 % (v/v)

Erwartete Werte

In der klinischen Xpert MRSA/SA SSTI-Studie wurden insgesamt 848 SSTI-Proben aus vier großen Krankenhäusern in den USA untersucht. Anzahl und Prozentanteil positiver Fälle gemäß dem Referenzkulturverfahren werden nach Altersgruppen in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3. Festgestellte Prävalenz von MRSA und SA nach Kultur

Altersgruppe	Gesamtanzahl	MRSA nach Kultur		SA nach Kultur	
		Anzahl positiver Fälle	Festgestellte Prävalenz	Anzahl positiver Fälle	Festgestellte Prävalenz
Unter 3-Jährige	34	11	32,4 %	21	61,8 %
3- bis 18-Jährige	100	25	25,0 %	55	55,0 %
19- bis 65-Jährige	614	188	30,6 %	300	48,9 %
66-Jährige und Ältere	100	22	22,0 %	35	35,0 %

Leistungsmerkmale

Klinische Leistung

Die Leistungsmerkmale der Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung wurden in den Vereinigten Staaten im Rahmen einer multizentrischen Prospektiv-Forschungsstudie an vier Institutionen ermittelt, indem die Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung mit dem Referenzkulturverfahren verglichen wurde. Zu den Patienten gehörten Personen, für deren Routineversorgung ein Abstrich aus der Haut- und Weichgewebeinfektion des Patienten zur Ansetzung einer Kultur erforderlich war.

Bei jedem Patienten wurden doppelte Abstriche entnommen. Ein Abstrich wurde mit dem Xpert MRSA/SA SSTI-Verfahren in dem Zentrum untersucht, bei dem der Patient registriert war, während der andere Abstrich nach dem Standardverfahren dieser Einrichtung getestet wurde. Die verbleibende Probe wurde für Referenzkulturtests an das Zentrallabor gesendet.

In dem zentralen Labor wurde die Probe über Nacht in tryptischer Soja-Bouillon mit 6,5 % NaCl angereichert. Die tryptische Soja-Bouillon wurde anschließend auf Platten mit Cefoxitin (für MRSA) und ohne Cefoxitin (für SA) ausgestrichen. Wenn eine oder beide der SA- oder MRSA-Platten vermutete Kolonien von *S. aureus* aufwies, wurden die Kolonien auf einer Blutagarplatte subkultiviert. Die Bestätigung der vermutet positiven Kolonien erfolgte mittels Katalase, Röhrchen-Koagulase und Gram-Färbung. Die von *MecA* bewirkte Oxacillin-Resistenz wurde durch Disk-Diffusionstests mit einer 30-µg-Cefoxitin-Disk and einem Ausschnitt von 21/22 mm ermittelt. Wenn die Kulturen für die SA- und die MRSA-Platten beide negativ waren, wurde die archivierte tryptische Soja-Bouillon mit 6,5 % NaCl auf Blutagar subkultiviert und anschließend auf SA/MRSA untersucht wie oben beschrieben.

Die Leistung der Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung wurde im Verhältnis zu den Referenzkulturergebnissen berechnet.

Gesamtergebnisse

Insgesamt wurden mit der Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung und im Kulturverfahren 848 Proben auf MRSA und SA getestet.

Von diesen 848 Fällen waren 207 Patienten innerhalb von drei Wochen vor der Probenentnahme mit Antibiotika behandelt worden, bei 441 Patienten war dies nicht der Fall gewesen und in 200 Fällen war nicht bekannt, ob Antibiotika genommen worden waren oder nicht. Eine statistisch signifikante Abnahme der SA-positiven Ergebnisse bei Kulturverfahren wurde nach Einnahme von Antibiotika festgestellt (p=0,007); dies wird auch in der Literatur berichtet.[10, 11, 12, 13, 14] Auch für die MRSA-positiven Ergebnisse wurde bei Kulturverfahren eine Abnahme festgestellt, wenngleich in geringerem Ausmaß (p=0,022). Diese Abnahme positiver Ergebnisse nach Einnahme von Antibiotika wurde bei der Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung nicht festgestellt. Auch wurde keine Inhibition der Untersuchung bei Vorhandensein topischer Antibiotika (siehe „interferierende Substanzen“) verzeichnet. Die geringeren Anteile positiver Fälle im Kulturverfahren für MRSA und SA bei Vorhandensein von Antibiotika verursachten die höher als erwartet ausfallenden Anteile falsch-positiver Fälle bei der Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung.

Bei fünf (5) der 246 MRSA-positiven Kulturen lagen Mischinfektionen von MRSA und SA vor. Xpert MRSA/SA SSTI identifizierte 3 der 5 Mischinfektionen als MRSA-positiv und 2 der 5 Fälle als SA-positiv/MRSA-negativ.

Die Leistung des Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung wird in den Tabellen 4 bis 6 zusammengefasst.

Tabelle 4. MRSA/SA-Leistung bei Patienten ohne Antibiotikaeinnahme (innerhalb von 3 Wochen vor der Probenentnahme) im Verhältnis zum Referenzkulturverfahren

		Kultur			
		MRSA+	**SA+/MRSA-**	**Neg/Kein Wachstum**	**Insgesamt**
Xpert	MRSA+	137[a]	2	6	145
	SA+/MRSA-	3[b]	79	16	98
	SA-	6	4	188	198
	Insgesamt	146	85	210	441

[a] In 1 der 137 Fälle lag eine Mischinfektion mit MRSA und SA vor.
[b] In 2 der 3 Fälle lagen Mischinfektionen mit MRSA und SA vor.

Prozentuale positive Übereinstimmung (MRSA+) = 93,8; 95 % Konfidenzintervall = 88,6 – 97,1

Prozentuale negative Übereinstimmung (MRSA+) = 97,3; 95 % Konfidenzintervall = 94,7 – 98,8

Prozentuale positive Übereinstimmung (SA+/MRSA+) = 95,7; 95 % Konfidenzintervall = 92,2 – 97,9

Prozentuale negative Übereinstimmung (SA+/MRSA+) = 89,5; 95 % Konfidenzintervall = 84,6 – 93,3

Von den Patienten ohne Antibiotikaeinnahme innerhalb von 3 Wochen vor der Probenentnahme wurden von der Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung 93,8 % der MRSA-positiven Proben und 97,3 % der MRSA-negativen Proben im Verhältnis zum Referenzkulturverfahren und 95,7 % der SA-positiven Proben und 89,5 % der SA-negativen Proben im Verhältnis zum Referenzkulturverfahren erkannt.

Von diesen Fällen ohne Antibiotikaeinsatz ergab sich bei 96,8 % (427 von 441) mit der Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung beim ersten Versuch erfolgreich ein Ergebnis. In den übrigen 14 Fällen ergaben sich beim ersten Versuch unbestimmte Ergebnisse (6 „INVALID“ (UNGÜLTIG), 7 „ERROR“ (FEHLER) und 1 „NO RESULT“ (KEIN ERGEBNIS)). Für alle 14 Fälle, die beim ersten Versuch unbestimmte Ergebnisse ergaben, wurde beim zweiten Versuch ein Ergebnis erzielt.

Tabelle 5. MRSA/SA-Leistung bei Patienten mit unbekannter Antibiotikaeinnahme (innerhalb von 3 Wochen vor der Probenentnahme) im Verhältnis zum Referenzkulturverfahren

		Kultur			
		MRSA+	**SA+/MRSA-**	**Neg/Kein Wachstum**	**Insgesamt**
Xpert	MRSA+	47[c]	0	4	51
	SA+/MRSA-	2	45	8	55
	SA-	1	2	91	94
	Insgesamt	50	47	103	200

[c] In 2 der 47 Fälle lagen Mischinfektionen mit MRSA und SA vor.

Prozentuale positive Übereinstimmung (MRSA+) = 94,0; 95 % Konfidenzintervall = 83,5 – 98,7

Prozentuale negative Übereinstimmung (MRSA+) = 97,3; 95 % Konfidenzintervall = 93,3 – 99,3

Prozentuale positive Übereinstimmung (SA+/MRSA+) = 96,9; 95 % Konfidenzintervall = 91,2 – 99,4

Prozentuale negative Übereinstimmung (SA+/MRSA+) = 88,3; 95 % Konfidenzintervall = 80,5 – 93,8

Von den Patienten, bei denen nicht bekannt war, ob sie innerhalb von 3 Wochen vor der Probenentnahme Antibiotika genommen hatten, wurden von der Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung 94,0 % der MRSA-positiven Proben und 97,3 % der MRSA-negativen Proben im Verhältnis zum Referenzkulturverfahren und 96,9 % der SA-positiven Proben und 88,3 % der SA-negativen Proben im Verhältnis zum Referenzkulturverfahren erkannt.

Von diesen Fällen mit unbekanntem Antibiotikaeinsatz ergab sich bei 97,0 % (194 von 200) mit der Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung beim ersten Versuch erfolgreich ein Ergebnis. In den übrigen 6 Fällen ergaben sich beim ersten Versuch unbestimmte Ergebnisse (2 „INVALID“ (UNGÜLTIG), 3 „ERROR“ (FEHLER) und 1 „NO RESULT“ (KEIN ERGEBNIS)). Für alle 6 Fälle, die beim ersten Versuch unbestimmte Ergebnisse ergaben, wurde beim zweiten Versuch ein Ergebnis erzielt.

Tabelle 6. MRSA/SA-Leistung bei Patienten mit bekannter Antibiotikaeinnahme (innerhalb von 3 Wochen vor der Probenentnahme) im Verhältnis zum Referenzkulturverfahren

		Kultur			
		MRSA+	**SA+/MRSA-**	**Neg/Kein Wachstum**	**Insgesamt**
Xpert	MRSA+	44	2	10	56
	SA+/MRSA-	3	31	19	53
	SA-	3	1	94	98
	Insgesamt	50	34	123	207

Prozentuale positive Übereinstimmung (MRSA+) = 88,0; 95 % Konfidenzintervall = 75,7 – 95,5

Prozentuale negative Übereinstimmung (MRSA+) = 92,4; 95 % Konfidenzintervall = 87,0 – 96,0

Prozentuale positive Übereinstimmung (SA+/MRSA+) = 95,2; 95 % Konfidenzintervall = 88,3 – 98,7

Prozentuale negative Übereinstimmung (SA+/MRSA+) = 76,4; 95 % Konfidenzintervall = 67,9 – 83,6

Von den Patienten mit bekannter Antibiotikaeinnahme innerhalb von 3 Wochen vor der Probenentnahme wurden von der Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung 88,0 % der MRSA-positiven Proben und 92,4 % der MRSA-negativen Proben im Verhältnis zum Referenzkulturverfahren und 95,2 % der SA-positiven Proben und 76,4 % der SA-negativen Proben im Verhältnis zum Referenzkulturverfahren erkannt.

Von diesen Fällen mit Antibiotikaeinsatz ergab sich bei 96,1 % (199 von 207) der Proben mit der Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung beim ersten Versuch erfolgreich ein Ergebnis. In den übrigen 8 Fällen ergaben sich beim ersten Versuch unbestimmte Ergebnisse (5 „INVALID“ (UNGÜLTIG) und 3 „ERROR“ (FEHLER)). Für alle 8 Fälle, die beim ersten Versuch unbestimmte Ergebnisse ergaben, wurde beim zweiten Versuch ein Ergebnis erzielt.

Varianten mit leerer Kassette

Damit ein Isolat von der Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung als MRSA-positiv erkannt wird, müssen der Test auf *spa* sowie der Test auf *mecA* und SCC*mec* positiv sein. Ein Isolat, das positiv für *spa* und SCC*mec*, jedoch nicht für *mecA* ist, wird aufgrund seiner Methicillin-Empfindlichkeit als SA gemeldet. Dieser Fall kann eintreten, wenn der Teil des SCC*mec*-Elements, der *mecA* trägt, herausgetrennt wird, die Enden dieses mobilen Elements jedoch an Ort und Stelle verbleiben, wodurch sich ein positives SCC*mec*-Signal ergibt. Solche Isolate werden manchmal als „Varianten mit leerer Kassette“ bezeichnet und sind im klinischen Alltag nicht unüblich. Die Bedeutung dieser Isolate besteht in der potenziellen Verfälschung von Untersuchungen auf MRSA, bei denen das Gen *mecA* nicht direkt erkannt wird. Die Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung wurde dafür konzipiert, diese Varianten korrekt als SA zu identifizieren.

Von den Proben, die Gegenstand der Datenanalysen in diesem Bericht waren, entsprachen insgesamt 16 Isolate dem Profil der leeren Kassette mit positiven Testergebnissen für *spa* und SCC*mec*, aber ohne Nachweis von *mecA* (Ct = 0), wie in Tabelle 7 dargestellt. Fünfzehn (15) der 16 wurden als echte MRSA-negative Isolate im Verhältnis zum Kulturverfahren und 14 der 16 wurden als echte SA-positive Isolate im Verhältnis zum Kulturverfahren bestätigt. Ein Isolat wurde gemäß Kulturverfahren als MRSA identifiziert und 2 Isolate waren gemäß Kulturverfahren sowohl MRSA- als auch SA-negativ.

Tabelle 7. MRSA/SA SSTI-Leistung gegenüber Referenzkulturverfahren – Varianten mit leerer Kassette

	Xpert	*spa*	*mecA*	SCC*mec*		Xpert / Kultur	
Fall Nr.	Ergebnis	(Ct)	(Ct)	(Ct)	Kultur	MRSA	SA
1	SA	23,6	0	26,0	SA	TN	TP
2	SA	14,7	0	16,5	SA	TN	TP
3	SA	20,5	0	34,0	SA	TN	TP
4	SA	18,4	0	21,0	SA	TN	TP
5	SA	15,6	0	28,4	MRSA	FN	TP
6	SA	17,2	0	31,6	SA	TN	TP
7	SA	34,1	0	35,6	Neg	TN	FP
8	SA	29,1	0	33,0	SA	TN	TP
9	SA	12,7	0	23,5	SA	TN	TP
10	SA	18,2	0	27,6	SA	TN	TP
11	SA	18,4	0	22,0	SA	TN	TP
12	SA	25,5	0	27,7	SA	TN	TP
13	SA	20,0	0	22,1	Neg	TN	FP
14	SA	26,0	0	28,3	SA	TN	TP
15	SA	23,9	0	25,7	SA	TN	TP
16	SA	19,9	0	34,0	SA	TN	TP

Analytische Leistung

Analytische Spezifität

Kreuzreaktivitätsstudie

Es wurden einhundertfünf (105) Stämme gesammelt, quantifiziert und mit der Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung getestet. Die 98 ATCC-Kulturen (American Type Culture Collection) und 7 NARSA-Stämme (Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus*) sind phylogenetisch mit *Staphylococcus aureus* und potenziell in einer Krankenhausumgebung zu findenden Arten verwandt.

Davon wurden Methicillin-empfindliche Koagulase-negative Staphylokokken (29) und Methicillin-resistente Koagulase-negative Staphylokokken (9) in die Tests einbezogen. Die untersuchten Organismen wurden als Gram-positiv (74), Gram-negativ (28) oder Hefe (3) identifiziert. Außerdem wurden die Organismen als aerob (95) oder anaerob (10) klassifiziert.

Mindestens zwei (2) Replikate jedes Isolats wurden mit 1,7-3,2 McFarland-Einheiten untersucht. Unter den Bedingungen der Studie waren alle Isolate MRSA-negativ und SA-negativ und keines der Isolate wurde durch die Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung nachgewiesen. Es wurden positive und negative Kontrollen in die Studie einbezogen. Die analytische Spezifität betrug 100 %.

Ermittlung von BORSA-Stämmen

Sieben (7) deutlich charakterisierte BORSA-Stämme (Borderline-Oxacillin-resistenter *Staphylococcus aureus*) wurden getestet, darunter eine anscheinend „leere Kassette“ (siehe oben). Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* ist resistent gegenüber allen ß-Laktam-Medikamenten durch das alternative Penicillin-bindende Protein PBP2a, das durch *mecA* codiert wird[15]. BORSA-Stämme sind *mecA*-negativ, weisen aber eine inhibitorische Mindestkonzentration (MIC) an Oxacillin ≥ 2 und ≤ 8 µg/ml auf. Eine Unterscheidung zwischen MRSA und BORSA ist von besonderer Bedeutung, um eine unnötige und unangebrachte Gabe von Vancomycin und Isolierungsmaßnahmen zu vermeiden, die bei Patienten mit einer Infektion durch einen ß-Laktam-empfindlichen Stamm nicht gerechtfertigt sind[16].

Unter den Bedingungen dieser Studie wurden alle 7 BORSA-Isolate (auch die anscheinend „leere Kassette“) in der Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung sowohl bei hohen als auch bei niedrigen Zellkonzentrationen als MRSA-negativ/SA-positiv nachgewiesen. Es wurden keine *mecA*-Signale erkannt. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass mit der Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung BORSA-Stämme korrekt als MRSA-negativ/SA-positiv erkannt werden und dass kein falsches positives MRSA-Testergebnis gemeldet wird.

Analytische Sensitivität

Studien zur Nachweisgrenze

Studien wurden zur Ermittlung der 95-%-Konfidenzintervalle der analytischen Nachweisgrenze (LoD) für Zellen von *Staphylococcus aureus* (SA) und Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA), die in einer Wundsurrogatmatrix menschlichen Ursprungs verdünnt wurden, durchgeführt. Die Wundsurrogatmatrix bestand aus einem Leukozytenkonzentrat, das durch Zentrifugieren aus Vollblut hergestellt wurde. Die Matrix enthielt ferner Erythrozyten und Plasma sowie eine geringe Menge Antikoagulanzien (CPD oder CPDA-1). Die Nachweisgrenze ist definiert als die niedrigste Anzahl der kolonienbildenden Einheiten (CFU) pro Probe, die reproduzierbar von negativen Proben mit einer Zuverlässigkeit von 95 % unterschieden werden können, oder als die niedrigste Konzentration, bei der 19 von 20 Replikaten positiv waren.

Für MRSA wurden 20 Replikate bei jeder getesteten MRSA-Konzentration (CFU/Abstrich) für 6 einzelne Isolate der SCC*mec*-Typen I, II, III, IVa, V und VI ausgewertet. Bei der Charakterisierung mit der Pulsed-Field-Gelelektrophorese (PFGE) waren USA100, der am häufigsten im Gesundheitswesen erworbene Stamm, und USA400, einer der am häufigsten auftretenden ambulant erworbenen Stämme, vertreten.

Für SA wurden 20 Replikate bei jeder SA-Konzentration (CFU/Abstrich) für 3 einzelne SA-Isolate ausgewertet. Die US-Arten USA900 und USA1200 waren vertreten.

Die Bewertung und die Konfidenzintervalle wurden unter Verwendung der logistischen Regression anhand von Daten (Anzahl der positiven Ergebnisse pro Anzahl der Replikate auf jeder Stufe) verteilt über den getesteten CFU/Abstrich-Bereich ermittelt. Die Konfidenzintervalle wurden mithilfe maximaler Wahrscheinlichkeitsbewertungen, basierend auf den logistischen Modellparametern, unter Verwendung der Varianz-Kovarianz-Matrix anhand großer Proben ermittelt. Die LoD-Punkt-Schätzwerte und das obere und untere 95%-Konfidenzintervall für jeden getesteten SA- und MRSA-SCC*mec* -Typ sind in den Tabellen 8 und 9 zusammengefasst.

Tabelle 8. 95-%-Konfidenzintervalle für die analytische Nachweisgrenze – SA

SA-Stamm-ID	PFGE	Nachweisgrenze (LoD) (CFU/Abstrich)	Unterer 95 % CI	Oberer 95 % CI
N7129	USA900	51	42	69
102-04	USA1200	87	76	109
29213	unbekannt	123	97	188

Tabelle 9. 95-%-Konfidenzintervalle für die analytische Nachweisgrenze – MRSA

MRSA-Stamm-ID	SCC*mec* Typ	PFGE	Nachweisgrenze (LoD) (CFU/Abstrich)	Unterer 95 % CI	Oberer 95 % CI
64/4176	I	USA500	221	195	271
N315	II	USA100	122	106	152
11373	III	unbekannt	124	115	155
MW2	IVa	USA400	82	68	113
ST59-MRSA-V	V	USA1000	242	208	305
HDE288	VI	USA800	183	161	223

Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass die Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung in 95 % der Fälle ein positives SA-Ergebnis mit einer Konfidenz von 95 % für einen Wundabstrich mit 150 CFU und in 95 % der Fälle ein positives MRSA-Ergebnis mit einer Konfidenz von 95 % für einen Wundabstrich mit 300 CFU erzielt.

Einhunderteinundzwanzig (121) weitere *Staphylococcus aureus*-Stämme wurden mit der Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung getestet. Über Nacht wurden Kulturen in BHI-Medium (Brain Heart Infusion) gezüchtet und auf 0,5 McFarland-Einheiten eingestellt. Alle Stämme wurden unter Verwendung von 100 µl Kultur, die 100.000- bis 1.000.000-fach verdünnt wurde, dreifach getestet.

MRSA- (78) und SA-Stämme (43) wurden ausgewählt, um weitgehend den Bereich genetischer Diversität zu repräsentieren, der bei der Spezies *Staphylococcus aureus* aufgrund der phylogenetischen Struktur angetroffen wird. Die ausgewählten Stämme stellen Primärlinien dar, wobei das Augenmerk auf spezifischen klonalen Komplexen liegt, in denen MRSA häufig festgestellt wird. Linien, die MRSA und SA enthielten, und solche, die ausschließlich SA enthielten, wurden einbezogen.

Die Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung erkannte 116 der 121 Stämme. Die 5 diskordanten Fälle wurden durch Katalase, Röhrchen-Koagulase und Gram-Färbung charakterisiert. Die von *MecA* bewirkte Oxacillin-Resistenz wurde durch Disk-Diffusion mit einer 30-µg-Cefoxitin-Disk and einem Durchmesser-Ausschnitt von 21/22 mm ermittelt.

Drei (3) der 78 MRSA-Stämme wurden von der Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung als MRSA-negativ/SA-positiv erkannt. Die weitere Charakterisierung ergab, dass diese Stämme nicht resistent sind und somit korrekt als MRSA-negativ/SA-positiv eingestuft wurden.

Zwei (2) der 43 SA-Stämme wurden von der Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung als MRSA-positiv/SA-positiv erkannt. Die weitere Charakterisierung ergab, dass diese Stämme resistent sind und somit korrekt als MRSA-positiv/SA-positiv eingestuft wurden.

Alle 12 bekannten USA300-Isolate wurden erwartungsgemäß als MRSA-positiv und SA-positiv erkannt.

Auswertung der Varianten mit „leerer Kassette“

Zweiundzwanzig (22) *Staphylococcus aureus*-Isolate, die als „Varianten mit leerer Kassette“ identifiziert worden waren, wurden mit der Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung getestet. Kulturen wurden über Nacht auf 0,5 McFarland-Einheiten eingestellt. Alle Stämme wurden anhand von Kulturen getestet, die 100-fach (hohe Konzentration) und 100.000-fach (niedrige Konzentration) verdünnt wurden.

Die Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchung erkannte alle 22 Isolate korrekt als MRSA-negativ und SA-positiv. Bei beiden getesteten Zellkonzentrationen wurden nur Ct-Werte für *spa* und SCC*mec* gemeldet. Es wurden keine *mecA*-Signale festgestellt.

Studie zur Kontaminationsübertragung

Eine Studie wurde durchgeführt, um nachzuweisen, dass die in sich abgeschlossenen Einweg-Testkartuschen des GeneXpert-Systems verhindern, dass Kontaminationen von deutlich positiven Proben auf negative Proben, die danach im selben GeneXpert-Modul untersucht werden, übertragen werden. Bei dieser Studie wurde eine negative Probe unmittelbar nach einer sehr stark MRSA-positiven Probe (ca. 10^7 CFU/Test) im selben GeneXpert-Modul untersucht. Dies wurde 20 Mal zwischen 2 GeneXpert-Modulen in insgesamt 42 Tests wiederholt. Es ergaben sich keine Hinweise auf eine Kontaminationsübertragung. Alle 21 positiven Proben wurden korrekt als MRSA-positiv/SA-positiv erkannt. Alle 21 negativen Proben wurden korrekt als MRSA-negativ/SA-negativ erkannt.

Reproduzierbarkeit

Eine Auswahl von 10 Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen von SA, MRSA und *Staphylococcus epidermidis* (negativ) wurde an 10 verschiedenen Tagen an jedem der drei Standorte zweifach getestet (10 Proben x 2 x 10 Tage x 3 Standorte). An jeder der 3 Testeinrichtungen wurden Xpert MRSA/SA-Kits derselben Charge verwendet. Xpert MRSA/SA-Tests wurden entsprechend dem Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchungsverfahren durchgeführt.

Tabelle 10. Zusammenfassung der Reproduzierbarkeitsergebnisse

Proben-ID	Standort 1	Standort 2	Standort 3	Gesamtübereinstimmung
Neg (MSSE)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (60/60)
SA Hoch Neg	100 % (20/20)	100 % (20/20)	90 % (18/20)	96,7 % (58/60)
SA Schwach Pos	100 % (20/20)	100 % (20/20)	95 % (19/20)	98,3 % (59/60)
MRSA1 Hoch Neg	100 % (20/20)	90 % (18/20)	100 % (20/20)	96,6 % (58/60)
MRSA1 Schwach Pos	100% (20/20)	100% (20/20)	90% (18/20)	96.6% (58/60)
MRSA2 Hoch Neg	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
MRSA2 Schwach Pos	100% (20/20)	95% (19/20)	95% (19/20)	96.6% (58/60)
Prozentuale Gesamtübereinstimmung nach Standort	100% (140/140)	97.9% (137/140)	95.7% (134/140)	97.9% (411/420)

Tabelle 11. Übersicht der Ergebnisse für Ct-Werte nach Probenstufe und Sonde

SPC			
Stufe	**Mittelwert**	**Std.abw.**	**% CV**
MRSA1 Hoch Neg	34,52	0,82	2,36
MRSA2 Hoch Neg	34,46	0,85	2,46
Neg (MSSE)	34,44	0,90	2,62
SA Hoch Neg	34,38	0,92	2,66
Spa			
Stufe	**Mittelwert**	**Std.abw.**	**% CV**
MRSA1 Schwach Pos	32,96	0,8	2,44
MRSA2 Schwach Pos	31,05	0,69	2,21
SA Schwach Pos	33,91	0,8	2,35
mecA			
Stufe	**Mittelwert**	**Std.abw.**	**% CV**
MRSA1 Schwach Pos	33,25	0,80	2,40
MRSA2 Schwach Pos	31,50	0,68	2,16
SCC*mec*			
Stufe	**Mittelwert**	**Std.abw.**	**% CV**
MRSA1 Schwach Pos	34,19	0,90	2,63
MRSA2 Schwach Pos	33,13	0,68	2,05

Eine zweite Reproduzierbarkeitsuntersuchung wurde an einer Auswahl von 4 Proben (SA: 10x LoD, MRSA1: 10x LoD, MRSA2: 10x LoD und negative Kontrolle: *Staphylococcus epidermidis*) durchgeführt. Die Proben wurden an 10 verschiedenen Tagen an jedem der drei Standorte zweifach getestet (4 Patientenproben x 2/Tag x 10 Tage x 3 Standorte). An jeder der 3 Testeinrichtungen wurden Xpert MRSA/SA SSTI-Tests derselben Charge verwendet. Die Xpert MRSA/SA SSTI-Tests wurden entsprechend dem Xpert MRSA/SA SSTI-Untersuchungsverfahren durchgeführt. In 239 der 240 Tests wurden die korrekten Werte ermittelt.

Tabelle 12. Zusammenfassung der Reproduzierbarkeitsergebnisse

Patientenproben-ID	Standort 1	Standort 2	Standort 3	Gesamtübereinstimmung
Neg (MSSE)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (60/60)
SA Mittel Pos[1]	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (60/60)
MRSA1 Mittel Pos[1]	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (60/60)
MRSA2 Mittel Pos[1]	100 % (20/20)	100 % (20/20)	95 % (19/20)	98,3 % (59/60)
Prozentuale Gesamtübereinstimmung nach Standort	100 % (80/80)	100 % (80/80)	98,8 % (79/80)	99,6 % (239/240)

[1] 10xLoD

Tabelle 13. Übersicht der Ergebnisse für Ct-Werte nach Probenstufe und Sonde

SPC			
Stufe	**Mittelwert**	**Std.abw.**	**% CV**
MRSA1 Mittel Pos	35,72	1,87	5,24
MRSA2 Mittel Pos	36,29	2,66	7,34
SA Mittel Pos	34,55	1,19	3,44
NEG	34,45	1,06	3,09
Spa			
Stufe	**Mittelwert**	**Std.abw.**	**% CV**
MRSA1 Mittel Pos	29,52	1,30	4,40
MRSA2 Mittel Pos	28,91	1,03	3,57
SA Mittel Pos	30,59	0,91	2,99
mecA			
Stufe	**Mittelwert**	**Std.abw.**	**% CV**
MRSA1 Mittel Pos	29,78	1,28	4,29
MRSA2 Mittel Pos	29,32	1,24	4,22
SCC*mec*			
Stufe	**Mittelwert**	**Std.abw.**	**% CV**
MRSA1 Mittel Pos	31,49	1,26	3,99
MRSA2 Mittel Pos	31,05	1,12	3,59

Quellenangaben

1. Bannerman TL. 2003 Kapitel 28: Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci that Grow Aerobically. Manual of clinical microbiology, 8th ed. ASM Press Washington, DC. Seite 384-404.
2. Mainous AG, Hueston WJ, Everett, et al. 2006. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *S aureus* in the United States, 2001-2002. An Family Medicine. 4(2):132-137.
3. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. Am J Infect Control 2004;32:470-85.
4. Chaix C, Durand-Zileski I, Alberti C, Buisson B. 1999. Control of Endemic Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. JAMA 282(19):1745-51.
5. Shopsin B, Kreiswirth BN. 2001. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Emerging Infectious Diseases 7(2) 323-6.
6. Salgado CD et al. 2003. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Meta-analysis of Prevalence and Risk Factors. CID 36:131.
7. Donnio, P-Y, Février F, Bifani P, et al. 2007. Molecular and epidemiological evidence for the spread of multiresistant methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains in hospitals. Antimicrobial. Agents Chemother. 51: 4342 – 4350.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). HHS Publication number (CDC) 93-8395.
9. 7 Clinical and Laboratory Standards Institute (früher National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (siehe letzte Ausgabe).
10. Ewig S, Schlochtermeier M, Göke N, et al. 2002. Applying sputum as a diagnostic tool in pneumonia: limited yield, minimal impact on treatment decisions. Chest. 121:1486-1492.
11. RG Dotson and SK Pingleton. 1993. The effect of antibiotic therapy on recovery of intracellular bacteria from bronchoalveolar lavage in suspected ventilator-associated nosocomial pneumonia. Chest. 103, 541-546.

12. Souweine B, Veber B, Bedos JP, et al. 1998. Diagnostic accuracy of protected specimen brush and bronchoalveolar lavage in nosocomial pneumonia: impact of previous antimicrobial treatments. Crit Care Med. Feb;26(2):236-244.

13. Kanegaye JT, Soliemanzadeh P, Bradley JS, et al. 2001. Lumbar puncture in pediatric bacterial meningitis: defining the time interval for recovery of cerebrospinal fluid pathogens after parenteral antibiotic pretreatment. Pediatrics. 108(5):1169-1174.

14. Brook I, Gober A. 2005. Effects of amoxicillin and cefdinir on nasopharyngeal bacterial flora. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. Sep;131:785-787.

15. Nadarajah J, et. al., Identification of different clonal complexes and diverse amino acid substitutions in penicillin-binding protein 2 (PBP2) associated with borderline oxacillin resistance in Canadian *Staphylococcus aureus* isolates. J of Med Micro (2006), 55: 1675-1683.

16. Ribeiro J, et. al., Misclassification of Susceptible Strains of *Staphylococcus aureus* as Methicillin-Resistant *S. aureus* by a rapid Automated Susceptibility Testing System. (1999), 37: 1619-1620.

Unterstützung

Wenn Sie Unterstützung benötigen, wenden Sie sich bitte mithilfe der folgenden Kontaktadressen an Cepheid. Geben Sie bei Ihrem Anruf bzw. in Ihrer E-Mail auf jeden Fall die Seriennummer des Instruments und die Chargen-ID des Reagenz an.

EU

Kontaktdaten für technischen Support:

Tel: +33.563.82.53.19

E-Mail: techsupport@cepheideurope.fr

Andere Standorte

Wenden Sie sich an Ihre lokale Cepheid-Niederlassung oder -Vertretung.

Symboltabelle

Symbol	Bedeutung
REF	Katalog-Nr.
IVD	Medizinisches Gerät zur *In-vitro*-Diagnostik
2	Nicht wiederverwenden
LOT	Chargencode
!	Vorsicht, beiliegendes Dokument konsultieren
	Hersteller
Σ	Reicht für <n> Tests
	Verfallsdatum
CONTROL	Kontrolle
EC REP	Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
CE	CE-Kennzeichnung – EU
	Temperaturbegrenzung
	Biologische Risiken

Cepheid AB
Röntgenvägen 5
SE-171 54 Solna
Schweden

Hergestellt in Schweden

Cepheid Europe
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
Frankreich

Tel: +33.563.82.53.00
Fax: +33.563.82.53.01
E-Mail: cepheid@cepheideurope.fr

Español

Para uso exclusivo de diagnóstico *in vitro*

Denominación común

Xpert® MRSA/SA SSTI

Nombre común o de uso frecuente

Ensayo de Xpert MRSA/SA SSTI

Uso previsto

El Ensayo Xpert MRSA/SA de Cepheid para infecciones de piel y tejidos blandos (Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI) realizado en el Sistema GeneXpert® Dx es una prueba de diagnóstico cualitativa *in vitro* diseñada para detectar la presencia de *Staphylococcus aureus* (SA) y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) en muestras de infecciones de piel y tejidos blandos. En esta prueba se utiliza una reacción en cadena de la polimerasa (RCP) en tiempo real con el objeto de detectar el ADN del MRSA/SA. El ensayo Xpert MRSA/SA SSTI está indicado para su uso conjunto con otras pruebas de laboratorio como cultivos de microbiología y con datos clínicos al alcance del médico como ayuda para la detección de MRSA/SA en infecciones de piel y tejidos blandos. El Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI no está diseñado para supervisar tratamientos de infecciones por MRSA/SA. Los cultivos concomitantes de SA y MRSA son necesarios para recuperar organismos destinados a pruebas de sensibilidad o a clasificaciones epidemiológicas.

Resumen y explicación

El *Staphylococcus aureus* (SA) es un patógeno oportunista humano bien documentado, además de un patógeno nosocomial principal, responsable de diversas enfermedades. Entre ellas, infecciones de la piel y los tejidos blandos, como carbuncos y furúnculos, e infecciones de heridas postoperatorias en distintas localizaciones. Como patógeno nosocomial, el *S. aureus* ha sido una causa importante de morbilidad y mortalidad. Las infecciones por *S. aureus* son a menudo agudas y piogénicas, y si no reciben tratamiento, pueden propagarse a tejidos circundantes o mediante bacteriemia a lugares metastáticos (afectando a otros órganos). Algunas de las infecciones más graves producidas por el *S. aureus* son bacteriemia, neumonía, osteomielitis, endocarditis aguda, síndrome de shock tóxico, intoxicación por alimentos, miocarditis, pericarditis, cerebritis, meningitis, corioamnionitis, síndrome de la piel escaldada y abscesos en músculos, tracto urogenital, sistema nervioso central y varios órganos intraabdominales[1].

A principios de la década de 1950, la adquisición y expansión de los plásmidos productores de beta-lactamasa frustraron la efectividad de la penicilina para el tratamiento de las infecciones por *S. Aureus*. En 1959, se introdujo la meticilina, una penicilina sintética. No obstante, en 1960 se identificaron las primeras cepas de *S. Aureus* resistentes a la meticilina. Se determinó entonces que esto era el resultado de la adquisición por parte del *S. aureus* del gen *mecA*. Hoy en día, en los EE.UU. el MRSA es responsable de, aproximadamente, el 25% de las infecciones nocosomiales y están aumentando los informes de MRSA adquirido en la comunidad, lo cual repercute significativamente en la morbilidad y en la mortalidad. Se han detectado mortalidades del 33% y el 16% atribuibles al MRSA y a bacteriemias por *S. aureus* (SA) sensible a la meticilina, respectivamente. También preocupan cada vez más los costes derivados de las infecciones por MRSA. En un intento por limitar la extensión de estas infecciones, se están desarrollando e implementando estrategias y políticas de control en instalaciones médicas. El control del MRSA es el principal objetivo de la mayoría de los programas de control de infecciones hospitalarias. Actualmente, el método estándar de detección de MRSA es el cultivo, método muy laborioso que puede tardar varios días en generar un resultado definitivo.[2,3,4,5,6,7]

Principio del procedimiento

El sistema GeneXpert Dx automatiza e integra la purificación de muestras, la multiplicación del ácido nucleico y la detección de la secuencia objetivo en muestras sencillas o complejas mediante ensayos de RCP en tiempo real. El sistema consta de un instrumento, un ordenador personal y un software cargado previamente para ejecutar pruebas y visualizar los resultados. Este sistema requiere el uso de cartuchos desechables de un solo uso para los reactivos y el proceso de RCP. Dado que los cartuchos son independientes, se minimiza el riesgo de contaminación cruzada entre muestras. Si desea obtener una descripción detallada del sistema, consulte el *Manual del operador del sistema GeneXpert Dx*.

El Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI incluye reactivos para la detección del MRSA y el SA, así como el control de procesamiento de muestra (CPM) para el procesamiento adecuado de las bacterias diana y para supervisar la presencia de inhibidores en la RCP. El CPM también garantiza que las condiciones de la reacción de RCP (temperatura y tiempo) sean las adecuadas para la reacción de amplificación y que los reactivos RCP sean funcionales. Mediante la función de comprobación de sonda (PCC, por sus siglas en inglés), se comprueba la rehidratación de los reactivos, el llenado del tubo de RCP en el cartucho, la integridad de la sonda y la estabilidad del fluorocromo.

Los iniciadores y sondas del Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI detectan secuencias exclusivas de la proteína A del estafilococo (*spa*), el gen resistente a la meticilina (*mecA*), y el cromosoma con casete de estafilococo (SCC*mec*) insertado en el sitio cromosómico (*attB*) del SA.

Reactivos e instrumentos

Material suministrado

El kit de Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI contiene suficientes reactivos para procesar 10 especímenes o muestras de control de calidad. El kit incluye lo siguiente:

Cartuchos de Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI con tubos de reacción integrados	**10**
Perlas 1, 2, 3 (liofilizadas)	**1 por cartucho**
Reactivo 1 del Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI	**2,8 ml por cartucho**
Reactivo 2 del Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI	**3,2 ml por cartucho**
Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI reactivo de dilución	**10**
Reactivo de dilución (Tiocianato de guanidina)	**1 x 2,0 ml por bolsa**
CD	**1 por kit**
Archivo de definición del ensayo (ADF)	
Instrucciones para importer el ADF en el sistema GX	
Instrucciones	

Notas:

- Las fichas de datos de seguridad (SDS, Safety Data Sheets) están disponibles en www.cepheid.com/tests-and-reagents/literature/msds o www.cepheidinternational.com/tests-and-reagents/literature/msds.
- La albúmina sérica bovina (BSA) en las microesferas contenidas en este producto se obtuvo exclusivamente a partir de plasma bovino originario de Estados Unidos. También la BSA se fabrica en Estados Unidos. No se alimentó a los animales con proteínas de rumiante ni otras proteínas de origen animal; los animales fueron sometidos a pruebas ante y post mortem. Durante el procesamiento no se produjo mezcla alguna del material con otras materias de origen animal.

Almacenamiento y manipulación

- Conserve los cartuchos y reactivos del Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI a 2 – 28 ˚C.
- No utilice reactivos o cartuchos después de la fecha de caducidad indicada.
- No abra un cartucho hasta que esté preparado para realizar la prueba.
- Utilice el cartucho y los reactivos antes de que transcurran 30 minutos después de abrir la tapa del cartucho.
- No utilice los reactivos si observa que están turbios o se han decolorado.

Material necesario no suministrado

- Sistema GeneXpert Dx (el número de referencia varía según la configuración): Instrumento GeneXpert, ordenador, lector manual de códigos de barras y Manual del operador
- Impresora (consulte el *Manual del operador del sistema GeneXpert Dx* para conocer las indicaciones sobre compatibilidad)
- Dispositivo de recogida de muestras de Cepheid (900-0370) o equivalente Copan
- Mezclador Vortex
- Pipetas de transferencia desechables
- Gasa estéril

Materiales disponibles, pero no suministrados

KWIK-STIKs™ de MicroBiologics, n.º de referencia 0158MRSA y n.º de referencia 0360SA como controles positivos, y n.º referencia 0371MSSE (*Staphylococcus epidermidis* sensible a la meticilina) como control negativo.

Advertencias y precauciones

- Trate todas las muestras biológicas, incluidos los cartuchos usados, como posibles agentes transmisores de infecciones. Al ser con frecuencia imposible saber qué muestras podrían ser infecciosas, todas las muestras biológicas deben tratarse tomando las precauciones habituales. Las directrices para la manipulación de muestras se pueden consultar en U.S. Center for Disease Control and Prevention[8], (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de EE.UU.) y el Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio) (anteriormente National Committee for Clinical Laboratory Standards (Comité Nacional de Control de Estándares de Laboratorio)).[9]

  En un cultivo mixto que contenga MRSA/SA y otros organismos (p. ej., bacilos Gram negativos u hongos), los resultados pueden ser falso negativos o variables en función de la concentración de MRSA/SA presente, especialmente si la concentración de MRSA/SA está cercana al LoD del ensayo.

- Respete las medidas de seguridad establecidas por su institución al trabajar con productos químicos y manipular muestras biológicas.
- El Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI puede detectar ADN de MRSA y/o SA de organismos no viables. La probabilidad de que esto ocurra aumenta en los pacientes que están tomando antibióticos.
- El Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI no proporciona resultados de pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Se necesita tiempo adicional para los cultivos y para realizar pruebas de sensibilidad.
- No sustituya el reactivo del ensayo Xpert MRSA/SA SSTI por ningún otro reactivo.
- No abra la tapa del cartucho del ensayo Xpert MRSA/SA SSTI excepto cuando vaya a añadir la muestra y el reactivo, o a repetir la prueba.
- No utilice un cartucho que se haya caído o agitado después de haber añadido la muestra y el reactivo.
- No use un cartucho con un tubo de reacción dañado.

- Cada cartucho Xpert MRSA/SA SSTI de un solo uso se utiliza para procesar una prueba. No reutilice los cartuchos.
- Para eliminar correctamente los cartuchos usados y no utilizados reactivos, consulte al personal de su institución encargado de eliminar los residuos. Puede que este material tenga algunas características que requieran una eliminación de residuos específica contemplada en la Resource Conservation and Recovery Act (RCRA, o Ley de Conservación y Recuperación de recursos) de la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU. Compruebe la normativa local y estatal ya que éstas pueden ser diferentes a las normativas de eliminación federales. Los centros que se encuentran fuera de los EE. UU. deben comprobar los requisitos para la eliminación de residuos de su país.

- Conserve el kit del Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI a 2 – 28 °C.
- No abrir la tapa del cartucho hasta el momento de procesar el test.

- El reactivo de elución contiene tiocianato de guanidina (H402, EUH301), que es nocivo para la vida acuática y el contacto con el ácido libera gas tóxico.

- El reactivo 2 contiene hidróxido de sodio; (H314), que es corrosivo para los ojos y la piel, y requiere el uso de protección ocular y cutánea.

Recogida, transporte y almacenamiento de muestras

Las muestras de infecciones de piel y tejidos blandos se pueden tomar con el Dispositivo de recogida de muestras Cepheid de acuerdo con los procedimientos estándar del centro del usuario. Los hisopos con las muestras se colocan de nuevo en el tubo de transporte de plástico (se recomienda medio líquido Stuarts, Dispositivo de recogida de muestras Cepheid o Copan), se almacenan a temperatura ambiente y se envían al área de pruebas de GeneXpert para procesarlas en el plazo del día siguiente al envío. Los hisopos restantes sin analizar destinados al cultivo microbiológico deben colocarse en sistemas de transporte apropiados y realizar el cultivo en un plazo de 4 días. Si no se envían antes del día siguiente, la muestra deberá transportarse en hielo. Como alternativa, los hisopos se pueden almacenar a 2 – 8 °C para analizarlos en el plazo máximo de 5 días.

Cultivo microbiológico

Para los métodos de cultivo SSTI, siga los actuales procedimientos operativos estándar del laboratorio. Para los cultivos, los hisopos restantes sin analizar deben colocarse en sistemas de transporte apropiados y realizar el cultivo en un plazo de 4 días.

Procedimiento

Preparación del cartucho

Importante: Inicie la prueba en un plazo de 15 minutos después de añadir los reactivos al cartucho.

Para añadir la muestra y el reactivo al cartucho:

1. Saque el cartucho y los reactivos del envase.
2. Extraiga el hisopo del recipiente de transporte.

Nota: Use una gasa estéril cuando manipule el hisopo para disminuir el riesgo de contaminación.

3. Inserte el hisopo en el tubo con el reactivo de dilución y rompa el hisopo.
4. Cierre el tapón del vial de dilución y agite a alta velocidad durante 10 segundos.
5. Abra la tapa del cartucho. Utilice una pipeta de transferencia estéril y transfiera todo el contenido del reactivo de dilución al compartimento "S" del cartucho de Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI.
6. Cierre la tapa del cartucho.

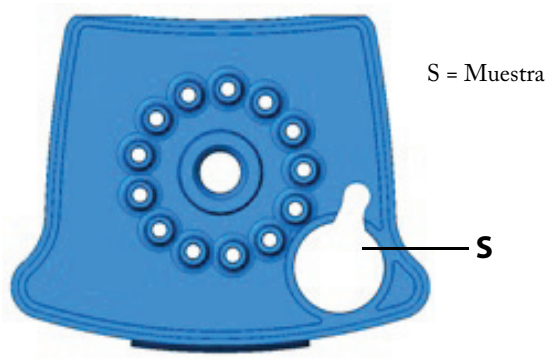

Figura 1. Cartucho del Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI (vista superior)

Inicio de la prueba

Importante: Antes de empezar la prueba, asegúrese de haber importado el archivo de definición del Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI en el software.

En esta sección se incluyen los pasos básicos para realizar la prueba. Si desea obtener instrucciones detalladas, consulte el *Manual del operador del sistema GeneXpert Dx*.

1. Encienda el instrumento GeneXpert Dx y, a continuación, encienda el ordenador. El software GeneXpert se iniciará automáticamente.
2. Inicie una sesión en el software del sistema GeneXpert Dx con su nombre de usuario y contraseña.
3. En la ventana del **sistema GeneXpert Dx**, haga clic en **Create Test** (**Crear prueba**). Aparece el cuadro de diálogo **Scan Cartridge Barcode** (**Escanear código de barras de cartucho**).
4. Escanee el código de barras del cartucho del Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI. Aparece la ventana **Create Test** (**Crear prueba**). Utilizando la información del código de barras, el software rellenará automáticamente los cuadros de los siguientes campos: Select Assay (Seleccionar ensayo), Reagent Lot ID (Id. de lote de reactivos), Cartridge SN (N.º de serie del cartucho) y Expiration Date (Fecha de caducidad).
5. En el cuadro **Sample ID** (**Id. de muestra**), escanee o escriba el Id. de muestra. Asegúrese de escribir el Id. de muestra correcto. El Id. de muestra está asociado a los resultados de la prueba y se muestra en la ventana **View Results** (**Ver resultados**) y en todos los informes.
6. Haga clic en **Start Test** (Iniciar prueba). En el cuadro de diálogo que aparece, escriba su contraseña.
7. Abra la puerta del módulo del instrumento mientras la luz esté parpadeando en verde y cargue el cartucho.
8. Cierre la puerta. La prueba se inicia y la luz verde deja de parpadear. Una vez finalizada la prueba, la luz se apaga.
9. Espere hasta que el sistema desbloquee la puerta para abrir la puerta del módulo y retirar el cartucho.

10. Los cartuchos usados deben desecharse en los contenedores de residuos de muestras apropiados de acuerdo con las prácticas estándar del centro.

Visualización e impresión de los resultados

Si desea obtener instrucciones detalladas sobre cómo ver e imprimir los resultados, consulte el *Manual del operador del sistema GeneXpert Dx*.

CONTROL

Control de calidad

Controles de calidad integrados

Cada prueba incluye un Control de procesamiento de muestras (CPM o BG3 en la pantalla de visualización de resultados para el usuario administrador) y un Control de comprobación de sonda (PCC).

- **Sample processing control, SPC** (Control de procesamiento de muestras, CPM): Garantiza que la muestra se ha procesado correctamente. El CPM contiene esporas de *Bacillus globigii* en forma de "pastel" de espora seca que se incluye en cada cartucho para comprobar el adecuado procesamiento de la muestra del Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI. El CPM comprueba si se ha producido la lisis de *Staphylococcus aureus* en caso de haber organismos y comprueba si el procesamiento de la muestra es correcto. Adicionalmente, este control detecta la inhibición asociada a la muestra del ensayo de RCP en tiempo real, garantiza que las condiciones de la reacción de RCP (temperatura y tiempo) sean las adecuadas para la reacción de amplificación y que los reactivos RCP sean funcionales. El CPM debe ser positivo en una muestra negativa y puede ser negativo o positivo en una muestra positiva. El CPM es correcto si cumple los criterios de aceptación validados.
- **Control de comprobación de sonda (PCC)**: antes de iniciar la reacción en cadena de la polimerasa, el sistema GeneXpert Dx mide la señal de fluorescencia de las sondas para controlar la rehidratación de las perlas, el llenado del tubo de reacción, la integridad de la sonda y la estabilidad del fluorocromo. La comprobación de sonda es correcta si cumple los criterios de aceptación asignados.

Controles externos

- Pueden utilizarse KWIK-STIKs (MicroBioLogics, n.º de referencia 0158MRSA [SCC*mec* tipo II] y n.º de referencia 0360SA como controles positivos, y n.º de referencia 0371MSSE como control negativo) para la formación de usuarios, para pruebas de aptitud y como CC externo del GeneXpert Dx System. Las cepas de MRSA que representan otros tipos del SCC*mec*, si están disponibles, pueden usarse como controles positivos externos adicionales para supervisar los iniciadores y las sondas que no se controlan directamente en el ensayo. Los controles externos pueden emplearse de acuerdo con las instituciones de acreditación y normativas gubernamentales, según corresponda. Siga el procedimiento de control externo de MicroBioLogics descrito a continuación:
  1. Abra la bolsa por la ranura y retire el KWIK-STIK.
  2. Perfore la parte inferior de la ampolla con la tapa para liberar el líquido hidratante.
  3. Manténgala en posición vertical mientras la golpea ligeramente para facilitar el flujo del líquido a través del eje hasta el fondo de la unidad que contiene el precipitado.
  4. A fin de facilitar la disolución del precipitado celular liofilizado, aplástelo y frote suavemente contra el compartimento inferior.
  5. Tire del KWIK-STIK para liberar el hisopo e inserte éste en el tubo que contiene el reactivo de dilución (tapón negro).
  6. El hisopo KWIK-STIK está preparado para la prueba del Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI.
  7. Si el CC externo no da el resultado esperado, repita la prueba de control externo o póngase en contacto con Cepheid para recibir ayuda.

En las figuras 2 a 5 se ilustran ejemplos de resultados del ensayo Xpert MRSA/SA SSTI.

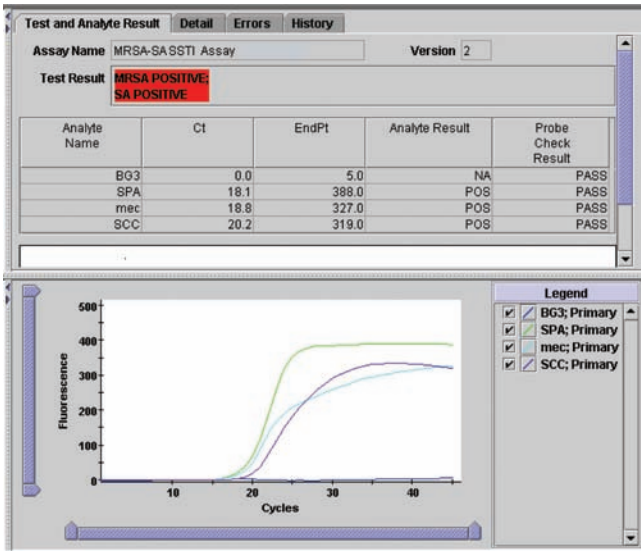

Figura 2. Ejemplo de un resultado positivo de MRSA/positivo de SA

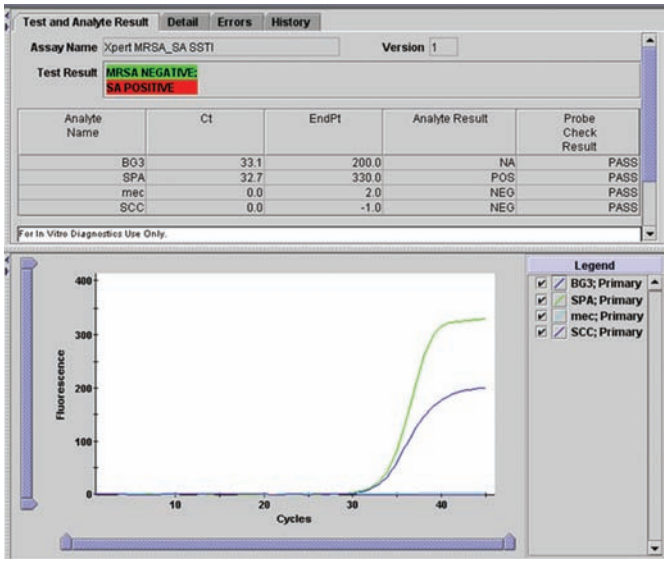

Figura 3. Ejemplo de un resultado negativo de MRSA/positivo de SA

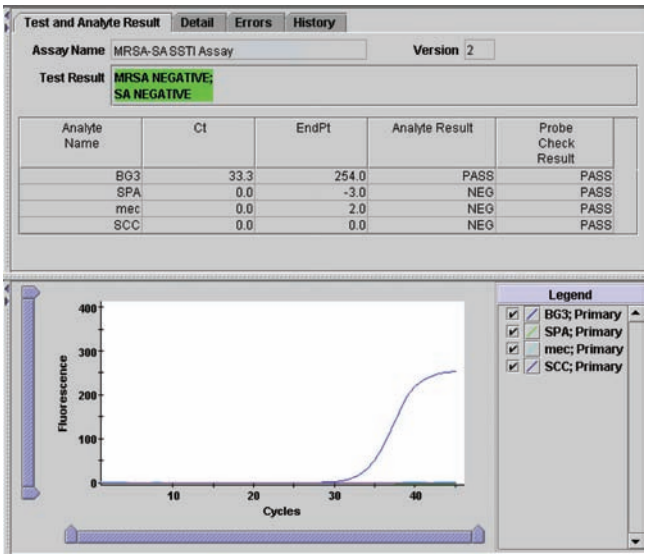

Figura 4. Ejemplo de un resultado negativo de MRSA/negativo de SA

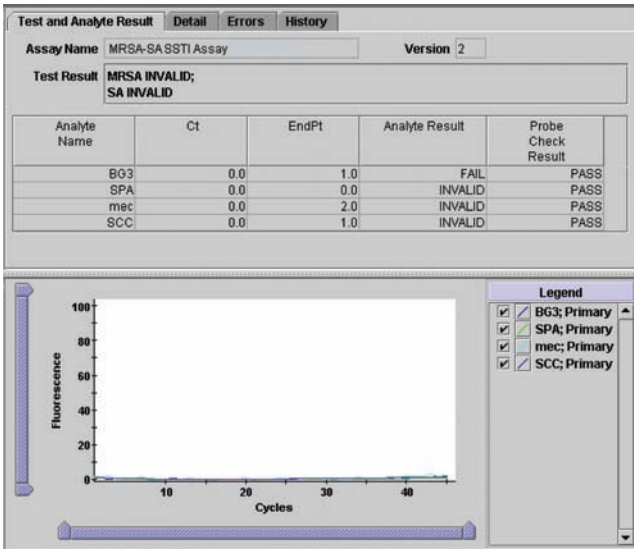

Figura 5. Ejemplo de resultado no válido

Interpretación de los resultados

El sistema GeneXpert Dx interpola los resultados a partir de las señales de fluorescencia medidas y los algoritmos de cálculo integrados y los muestra en la ventana **View Results** (**Ver resultados**). Los resultados posibles son:

MRSA POSITIVE/SA POSITIVE (MRSA POSITIVO/SA POSITIVO)
El Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI puede detectar ADN de MRSA y/o SA de organismos no viables.

Se detectan secuencias de ADN diana del MRSA/Se detecta secuencia de ADN diana del SA.

- MRSA POSITIVE — Todos los MRSA diana (*spa*, *mecA* y SCC*mec*) tienen un umbral de ciclo (Uc) dentro del rango válido y un punto final por encima de los parámetros mínimos.
- SPC — NA (no aplicable): El CPM se ignora porque la amplificación del MRSA puede competir con este control.
- Probe Check — PASS (APTA): Todos los resultados de la comprobación de sonda son aptos.

MRSA NEGATIVE/SA POSITIVE (MRSA NEGATIVO/SA POSITIVO)

El Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI puede detectar ADN de MRSA y/o SA de organismos no viables.

- No se detectan secuencias de ADN diana del MRSA/Se detecta secuencia de ADN diana del SA.
- SA POSITIVE — El SA diana (*spa*) tiene un Uc dentro del rango válido y un punto final por encima de los parámetros mínimos. No se detecta el ADN diana del SCC*mec*, puede que se detecte o no el ADN diana del *mecA*, o bien se detecta el ADN del SCC*mec* y no se detecta el ADN diana del *mecA* ("casete vacío").
- SPC — NA (no aplicable): El CPM se ignora porque la amplificación del SA puede competir con este control.
- Probe Check — PASS: Todos los resultados de la comprobación de sonda son aptos.

Un resultado de prueba positivo no indica necesariamente la presencia de organismos viables. No obstante, se puede suponer la presencia de MRSA o SA.

MRSA NEGATIVE/SA NEGATIVE (MRSA NEGATIVO/SA NEGATIVO)

No se detecta secuencia de ADN diana del *Staphylococcus aureus*. El CPM cumple los criterios de aceptación.

- NEGATIVE — No se detecta ADN diana del *Staphylococcus aureus* (*spa*). Puede que se detecte o no el ADN diana del *mecA*, o puede que se detecto o no el ADN diana del SCC*mec*.
- SPC — PASS: El CPM tiene un Uc dentro del rango válido y un punto final por encima de los parámetros mínimos.
- Probe Check — PASS: Todos los resultados de la comprobación de sonda son aptos.

Se podría obtener un falso negativo para MRSA (un resultado "MRSA NEGATIVE; SA POSITIVE" en lugar de "MRSA POSITIVE; SA POSITIVE") si en la muestra aparecen MRSA y SA en una proporción de MRSA:SA de $1{:}1x10^6$ o superior.

En los estudios clínicos, 5 de los 246 cultivos positivos de MRSA tenían infecciones mixtas por MRSA y SA. Xpert MRSA/SA SSTI identificó 3 de las 5 infecciones mixtas como MRSA positivas y 2 de las 5 como SA positivas/MRSA negativas.

INVALID (INVÁLIDO)

No se puede determinar la presencia o ausencia de secuencias de ADN diana del MRSA/SA. Repita la prueba de acuerdo con las instrucciones de la siguiente sección. El CPM no cumple los criterios de aceptación, la muestra no se ha procesado correctamente o se ha inhibido la reacción en cadena de la polimerasa.

- INVALID — No se puede determinar la presencia o ausencia de ADN de *Staphylococcus aureus*.
- SPC-FAIL (FALLA SPC) — El resultado del CPM diana es negativo, la Uc de CPM no se encuentra dentro del rango válido y el punto final está por debajo de los parámetros mínimos.
- Probe Check — PASS: Todos los resultados de la comprobación de sonda son aptos.

ERROR

No se puede detectar la presencia o ausencia de secuencias de ADN diana del MRSA/SA diana. Repita la prueba de acuerdo con las instrucciones de la siguiente sección. El Control de comprobación de sonda ha fallado, probablemente debido a que el tubo de reacción se ha llenado de forma inadecuada, se ha detectado un problema de integridad de la sonda o se han excedido los límites de presión máxima.

- MRSA — NO RESULT (SIN RESULTADO)
- SA — NO RESULT
- SPC — NO RESULT
- Probe Check — FAIL (FALLA SPC)*: Una o más comprobaciones de la sonda han fallado.

* Si la comprobación de sonda es correcta, el error se debe a un fallo de un componente del sistema.

NO RESULT (SIN RESULTADO)

No se puede determinar la presencia o ausencia de secuencias de ADN diana del MRSA/SA. Repita la prueba de acuerdo con las instrucciones de la siguiente sección. No se recogieron datos suficientes para conseguir un resultado de la prueba. Esto puede ocurrir, por ejemplo, si el operador detiene una prueba que estaba en progreso.

- MRSA — NO RESULT
- SA — NO RESULT
- SPC — NO RESULT
- Probe Check — NA (no aplicable)

Motivos para repetir el ensayo

Repita la prueba utilizando un cartucho nuevo (no reutilice cartuchos) y reactivos nuevos. Realice de nuevo la prueba en las 3 horas posteriores a la obtención de un resultado indeterminado.

Un resultado INVALID indica que el control CPM ha fallado. La muestra no se ha procesado correctamente o se ha inhibido la reacción en cadena de la polimerasa.

Un resultado ERROR indica que el Control de comprobación de la sonda ha fallado y que el ensayo ha sido anulado, probablemente debido a que el tubo de reacción se ha llenado de forma inadecuada, se ha detectado un problema de integridad del reactivo o se han superado los límites de presión máxima.

Un NO RESULT indica que no se han recogido suficientes datos. Por ejemplo, si el operador detiene una prueba que estaba en progreso.

Si un CC externo no tiene el rendimiento que se esperaba, repita la prueba de control externo o póngase en contacto con Cepheid para recibir ayuda.

Para volver a realizar la prueba:

Si se repite la prueba en un plazo de 3 horas de un resultado indeterminado*:

1. Transfiera el contenido restante del Compartimento S a un nuevo reactivo de dilución utilizando una pipeta de transferencia desechable.
2. Agite y añada todo el contenido del reactivo de dilución al Compartimento S del nuevo cartucho del Ensayo MRSA/SA SSTI.
3. Cierre la tapa e inicie la nueva prueba.

* Si no se puede repetir la prueba en un plazo de 3 horas, utilice una muestra nueva.

Limitaciones

El rendimiento del Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI se ha validado únicamente mediante los procedimientos suministrados con estas instrucciones. Las modificaciones de estos procedimientos pueden alterar el rendimiento de la prueba. Los resultados del Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI se deben interpretar junto con otros datos clínicos y de laboratorio a disposición del médico.

El Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI puede detectar ADN de MRSA y/o SA de organismos no viables. La probabilidad de que esto ocurre aumenta en los pacientes que están tomando antibióticos. En el estudio clínico pivotal, la tasa de falsos positivos (con relación al cultivo) en las pruebas de detección de SA en pacientes que usaban antibióticos realizadas en las 3 semanas anteriores a la prueba Xpert MRSA/SA, fue del 13,8%. La tasa de falsos positivos (con relación al cultivo) en las pruebas detección de MRSA en pacientes que usaban antibióticos realizadas en las 3 semanas anteriores a la prueba Xpert MRSA/SA, fue del 9,5%.

Un resultado de prueba positivo no indica necesariamente la presencia de organismos viables. No obstante, se puede suponer la presencia de MRSA o SA.

La prueba del Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI debe usarse como complemento a otros métodos disponibles.

Se pueden obtener resultados erróneos debido a una recogida de muestras incorrecta, si no se sigue el procedimiento de recogida, los procedimientos de manipulación o almacenamiento de muestras recomendados, en caso de error técnico, mezcla de la muestra o debido a que el número de organismos es demasiado reducido como para que la prueba lo detecte. El estricto cumplimiento de las instrucciones del embalaje es necesario para evitar resultados erróneos.

Debido a que la detección de MRSA y SA depende del número de organismos presentes en la muestra, los resultados fiables dependen de la recogida, manipulación y almacenamiento correctos de las muestras.

Las mutaciones o polimorfismos de los iniciadores o de las regiones de unión de la sonda pueden afectar a la detección de variantes nuevas o desconocidas de MRSA, generando un resultado falso negativo.

En las muestras que contienen MRSA y SA, es posible que el Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI no detecte los organismos SA resistentes a la meticilina. (Durante el estudio clínico pivotal, el Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI no detectó 2 de las 5 muestras positivas de cultivo de MRSA en situaciones documentadas de infecciones mixtas por MRSA/SA.)

En un cultivo mixto, el límite de detección analítico de MRSA es variable cuando hay presentes concentraciones extremadamente altas de SA. Se ha observado competencia por parte de SA en una proporción de MRSA:SA de $1:1x10^6$. En los estudios clínicos, 5 de los 246 cultivos positivos de MRSA tenían infecciones mixtas por MRSA y SA. Xpert MRSA/SA SSTI identificó 3 de las 5 infecciones mixtas como MRSA positiva y 2 de las 5 como SA positivo/MRSA negativo.

Se ha observado inhibición del Ensayo MRSA/SA SSTI con las siguientes sustancias: StaphA $^+$Septic (5% p/v), hidrocortisona (5% p/v) y limpiador para manos antibacteriano (5% p/v).

Las muestras que contienen mercurocromo no se pueden utilizar debido a su naturaleza fluorescente.

El Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI generará un resultado falso positivo de MRSA cuando analice una muestra de SSTI con infección mixta que contenga *Staphylococcus* coagulasa negativos sensibles a la meticilina (MRCNS) y *Staphylococcus aureus* (SA) sensibles a la meticilina de casete vacío.

Sustancias interferentes

En el estudio de investigación del Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI, se observó que 428 de las 848 muestras contenían sangre y que 404 contenían otras sustancias inespecíficas que podrían interferir en el ensayo (algunas de las muestras contenían más de un tipo de posible contaminante). Las pruebas exactas de Fisher realizadas con los datos obtenidos de las muestras con y sin estas sustancias potencialmente interferentes, demostraron que su presencia no afectaba al rendimiento del ensayo.

En un estudio no clínico se analizaron las sustancias potencialmente interferentes que podían estar presentes en muestras clínicas de infección de piel y tejidos blandos para evaluar su relación directa con el rendimiento del Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI. Las sustancias potencialmente interferentes presentes en las infecciones de piel y tejidos blandos pueden incluir, entre otras: sangre, pus, plasma, pomadas tópicas (antibióticos, antisépticos, calmantes), apósitos y tinturas. Las tablas 1 y 2 recogen todas estas sustancias, así como los ingredientes activos y las concentraciones con las que se han realizado pruebas. Se ha observado inhibición del Ensayo MRSA/SA SSTI con las siguientes sustancias: StaphA $^{+}$Septic (5% p/v), hidrocortisona (5% p/v) y limpiador para manos antibacteriano (5% p/v).

Las muestras que contienen mercurocromo no se pueden utilizar debido a su naturaleza fluorescente.

Tabla 1. Sustancias potencialmente interferentes analizadas

Sustancia	Ingrediente activo	% analizado
Búfer de TET (control)	Control	Control
Capa leucoplaquetaria (simuladora de heridas)	Leucocitos (1,5e9/ml)	50% (v/v)
Sangre total (libre de MRSA/SA)	N/A	50% (v/v)
Plasma	N/A	50% (v/v)
Neosporina	400 unidades de bacitracina 5.000 unidades de polimixina B 3,5 mg de neomicina	1% y 5% (p/v)
StaphA^{+}Septic	0,2% de cloruro de benzetonio, 2,5% de clorhidrato de lidocaína	1% y 5% (p/v)
Hidrocortisona	1% de hidrocortisona	1% y 5% (p/v)
Facilidad de la ebullición	20% de benzocaína	1% y 5% (p/v)
Tintura de yodo	2% de yodo	50% (v/v)

Tabla 2. Sustancias potencialmente interferentes analizadas

Sustancia	Ingrediente activo	% analizado
Búfer de TET (control)	Control	Control
Mupirocina	0,2% de cloruro de benzetonio, 2,5% de clorhidrato de lidocaína	5% (p/v)
Sangre total (libre de MRSA/SA)	N/A	50% (v/v)
Solución salina	0,65% de cloruro sódico	50% (v/v)
Limpiador para manos antibacteriano	62% de alcohol etílico	1% y 5% (p/v)
70% de alcohol isopropílico	70% de alcohol isopropílico	50% (v/v)

Valores previstos

En el estudio clínico de Xpert MRSA/SA SSTI, se incluyeron un total de 848 muestras de SSTI procedentes de cuatro hospitales de gran tamaño de diversos lugares de Estados Unidos. En Tabla 3 se presentan el número y el porcentaje de casos positivos obtenidos por el método de cultivo de referencia, calculados por grupo de edad.

Tabla 3. Prevalencia observada de MRSA y SA por cultivo

Grupo de edad	N total	MRSA por cultivo		SA por cultivo	
		Número de positivos	Prevalencia observada	Número de positivos	Prevalencia observada
Menores de 3 años	34	11	32,4%	21	61,8%
Entre 3 y 18 años	100	25	25,0%	55	55,0%
Entre 19 y 65 años	614	188	30,6%	300	48,9%
Mayores de 66	100	22	22,0%	35	35,0%

Características de funcionamiento

Resultados clínicos

Las características de funcionamiento del Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI se determinaron en un estudio de investigación prospectivo multicentro realizado en cuatro centros de EE.UU., en el que se comparó el Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI con un cultivo de referencia. Los sujetos incluyeron individuos cuya atención de rutina requería la recogida de un hisopo de la infección de la piel y tejidos blandos de los pacientes para su cultivo.

Se recogieron hisopos dobles de cada sujeto. Uno de los hisopos se analizó con el Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI en el centro de estudio y el otro con el método estándar del centro, y los demás se enviaron al laboratorio central para someterlos a una prueba de cultivo de referencia.

En el laboratorio central, la muestra se dejó enriquecer hasta el día siguiente en un caldo de soja tripticasa con un 6,5% de NaCl. El caldo de soja tripticasa se frotó en placas con cefoxitina (para MRSA) y sin cefoxitina (para SA). Si la placa de SA, la placa de MRSA o ambas, mostraban presuntas colonias de *S. aureus*, se preparaban en un subcultivabo de placa de agar sangre. La confirmación de las presuntas colonias positivas se llevó a cabo con catalasa, coagulasa en tubo y tinción de Gram. Se analizó la resistencia a la oxacilina mediada por el gen *MecA* en una prueba de difusión de disco utilizando un disco de 30 µg de cefoxitina con un límite de 21/22 mm. Si ambos cultivos de placas de SA y MRSA daban resultados negativos, se preparaba un subcultivo del caldo de soja tripticasa registrado con un 6,5% de NaCl en placa de agar sangre seguido de un tratamiento para SA/MRSA tal y como se ha descrito anteriormente.

El rendimiento del Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI se calculó en relación con los resultados del cultivo de referencia.

Resultados generales

Se sometieron a la prueba de MRSA y SA mediante el ensayo Xpert MRSA/SA SSTI y de cultivo a un total de 848 muestras.

De los 848 casos con datos aptos, 207 sujetos habían tomado antibióticos en las 3 semanas anteriores a la recogida de la muestra, 441 no habían tomado antibióticos y en 200 casos se desconocía este hecho. Se observó una reducción estadísticamente significativa en la tasa de positivos de SA con respecto a los resultados del cultivo cuando se habían utilizado antibióticos (p=0,007), un fenómeno que ya ha aparecido reflejado en la literatura.[10, 11, 12, 13, 14] La tasa de positivos de MRSA también fue inferior, aunque en menor medida (p=0,022). En el Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI no se observó una reducción de positivos cuando se habían utilizado antibióticos, ni tampoco se observó ninguna inhibición en presencia de antibióticos tópicos (consulte Sustancias interferentes). Las menores tasas de positivos en el cultivo de MRSA y SA en presencia de antibióticos explicaron las tasas de falso positivos más elevadas de lo esperado que se obtuvieron en el Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI.

Cinco (5) de los 246 cultivos positivos de MRSA tenían infecciones mixtas por MRSA y SA. Xpert MRSA/SA SSTI identificó 3 de las 5 infecciones mixtas como MRSA positiva y 2 de las 5 como SA positivo/MRSA negativo.

En las tablas 4 a 6 se resume el rendimiento del ensayo Xpert MRSA/SA SSTI.

Tabla 4. Rendimiento de MRSA/SA en sujetos que no usaban antibióticos (3 semanas antes de la recogida de la muestra) frente a cultivo de referencia

		Cultivo			
		MRSA+	**SA+/MRSA-**	**Neg./Sin crecimiento**	**Total**
Xpert	MRSA+	137[a]	2	6	145
	SA+/MRSA-	3[b]	79	16	98
	SA-	6	4	188	198
	Total	146	85	210	441

[a] 1 de las 137 era una infección mixta por MRSA y SA.
[b] 2 de las 3 eran infecciones mixtas por MRSA y SA.

Porcentaje de correspondencia positiva (MRSA+) = 93,8; 95% Intervalo de confianza = 88,6 – 97,1

Porcentaje de correspondencia negativa (MRSA+) = 97,3; 95% Intervalo de confianza = 94,7 – 98,8

Porcentaje de correspondencia positiva (SA+/MRSA+) = 95,7; 95% Intervalo de confianza = 92,2 – 97,9

Porcentaje de correspondencia negativa (SA+/MRSA+) = 89,5; 95% Intervalo de confianza = 84,6 – 93,3

En los sujetos que no usaron antibióticos 3 semanas antes de la recogida de la muestra, el Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI identificó un 93,8% de muestras positivas para MRSA y un 97,3% de muestras negativas para MRSA con respecto al método de cultivo de referencia, y un 95,7% de muestras positivas para SA y un 89,5% de muestras negativas para SA con respecto al método de cultivo de referencia.

De estos sujetos que no usaron antibióticos, el 96,8% (427/441) arrojó un resultado correcto en el primer Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI. Los 14 restantes arrojaron resultados indeterminados en el primer intento (6 “INVALID”, 7 “ERROR” y 1 “NO RESULT”). De los 14 resultados indeterminados del primer intento, todos dieron resultados en el segundo intento.

Tabla 5. Rendimiento de MRSA/SA en sujetos en los que se desconoce el uso de antibióticos (3 semanas antes de la recogida de la muestra) frente a cultivo de referencia

		Cultivo			
		MRSA+	**SA+/MRSA-**	**Neg./Sin crecimiento**	**Total**
Xpert	MRSA+	47[c]	0	4	51
	SA+/MRSA-	2	45	8	55
	SA-	1	2	91	94
	Total	50	47	103	200

[c] 2 2 de las 47 eran infecciones mixtas por MRSA y SA.

Porcentaje de correspondencia positiva (MRSA+) = 94,0; 95% Intervalo de confianza = 83,5 – 98,7

Porcentaje de correspondencia negativa (MRSA+) = 97,3; 95% Intervalo de confianza = 93,3 – 99,3

Porcentaje de correspondencia positiva (SA+/MRSA+) = 96,9; 95% Intervalo de confianza = 91,2 – 99,4

Porcentaje de correspondencia negativa (SA+/MRSA+) = 88,3; 95% Intervalo de confianza = 80,5 – 93,8

En los sujetos en los que se desconocía el uso de antibióticos 3 semanas antes de la recogida de la muestra, el Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI identificó un 94,0% de muestras positivas para MRSA y un 97,3% de muestras negativas para MRSA con respecto al método de cultivo de referencia, y un 96,9% de muestras positivas para SA y un 88,3% de muestras negativas para SA con respecto al método de cultivo de referencia.

De estos sujetos en los que se desconocía el uso de antibióticos, el 97,0% (194/200) arrojó un resultado correcto en el primer Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI. Los 6 restantes arrojaron resultados indeterminados en el primer intento (2 "INVALID", 3 "ERROR" y 1 "NO RESULT"). De los 6 resultados indeterminados en el primer intento, todos dieron resultados en el segundo intento.

Tabla 6. Rendimiento de MRSA/SA en sujetos en los que se conoce el uso de antibióticos (3 semanas antes de la recogida de la muestra) frente a cultivo de referencia

		Cultivo			
		MRSA+	**SA+/MRSA-**	**Neg./Sin crecimiento**	**Total**
Xpert	MRSA+	44	2	10	56
	SA+/MRSA-	3	31	19	53
	SA-	3	1	94	98
	Total	50	34	123	207

Porcentaje de correspondencia positiva (MRSA+) = 88,0; 95% Intervalo de confianza = 75,7 – 95,5

Porcentaje de correspondencia negativa (MRSA+) = 92,4; 95% Intervalo de confianza = 87,0 – 96,0

Porcentaje de correspondencia positiva (SA+/MRSA+) = 95,2; 95% Intervalo de confianza = 88,3 – 98,7

Porcentaje de correspondencia negativa (SA+/MRSA+) = 76,4; 95% Intervalo de confianza = 67,9 – 83,6

En los sujetos en los que se conoce el uso de antibióticos 3 semanas antes de la recogida de la muestra, el Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI identificó un 88,0% de muestras positivas para MRSA y un 92,4% de muestras negativas para MRSA con respecto al método de cultivo de referencia, y un 95,2% de muestras positivas para SA y un 76,4% de muestras negativas para SA con respecto al método de cultivo de referencia.

De estos sujetos en los que se conocía el uso de antibióticos, el 96,1% (199/207) de las pruebas aptas arrojó un resultado correcto en el primer Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI. Los 8 restantes arrojaron resultados indeterminados en el primer intento (5 "INVALID" y 3 "ERROR"). De los 8 resultados indeterminados en el primer intento, todos dieron resultados en el segundo intento.

Variantes de casete vacío

Para que una cepa sea identificada como MRSA positiva con el Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI, la prueba de *spa* debe ser positiva, así como la de *mecA* y SCC*mec*. Una cepa que sea positiva para *spa* y SCC*mec*, pero no para *mecA* recibe la consideración de SA por ser sensible a la meticilina. Esta situación se puede producir cuando se extirpa la porción del elemento del SCC*mec* que porta el *mecA*, pero los extremos de este elemento móvil siguen en su sitio, lo que produce una señal positiva de SCC*mec*. Estas cepas a veces se conocen como "variantes de casete vacío" y no son raras de encontrar en el entorno clínico. La importancia que tienen estas cepas es su potencial para confundir un ensayo para MRSA que no detecte directamente el gen *mecA*. El Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI se ha diseñado para identificar correctamente estas variantes como SA.

Entre las muestras aptas incluidas en los análisis de datos presentados en este informe, un total de 16 cepas coinciden con el perfil de casete vacío que produce resultados positivos de *spa* y SCC*mec*, pero sin detectar *mecA*, (Uc = 0), tal y como se muestra en la tabla 7. De las 16 cepas de MRSA, se identificaron 15 verdaderas positivas con respecto al cultivo. Una cepa se identificó como MRSA en el cultivo y 2 cepas eran negativas tanto en MRSA como en SA en el cultivo.

Tabla 7. Rendimiento de MRSA/SA SSTI frente a cultivo de referencia: variantes de casete vacío

	Xpert	*spa*	*mecA*	SCC*mec*		Xpert frente a cultivo	
Sujeto n.º	Resultado	(Uc)	(Uc)	(Uc)	Cultivo	MRSA	SA
1	SA	23,6	0	26,0	SA	TN	TP
2	SA	14,7	0	16,5	SA	TN	TP
3	SA	20,5	0	34,0	SA	TN	TP
4	SA	18,4	0	21,0	SA	TN	TP
5	SA	15,6	0	28,4	MRSA	FN	TP
6	SA	17,2	0	31,6	SA	TN	TP
7	SA	34,1	0	35,6	Neg	TN	FP
8	SA	29,1	0	33,0	SA	TN	TP
9	SA	12,7	0	23,5	SA	TN	TP
10	SA	18,2	0	27,6	SA	TN	TP
11	SA	18,4	0	22,0	SA	TN	TP
12	SA	25,5	0	27,7	SA	TN	TP
13	SA	20,0	0	22,1	Neg	TN	FP
14	SA	26,0	0	28,3	SA	TN	TP
15	SA	23,9	0	25,7	SA	TN	TP
16	SA	19,9	0	34,0	SA	TN	TP

Rendimiento analítico

Especificidad analítica

Estudio de reactividad cruzada

Se recogieron ciento cinco (105) cepas que se cuantificaron y analizaron con el Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI. Los 98 cultivos de la American Type Culture Collection (ATCC) y 7 cepas de la Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* (NARSA) representan especies relacionadas filogenéticamente con el *Staphylococcus aureus* o con especies potencialmente presentes en entornos hospitalarios.

En ellos se incluyeron 29 eran cepas de estafilococos coagulasa negativos sensibles a la meticilina y 9 eran cepas de estafilococos coagulasa negativos resistentes a la meticilina. Los organismos analizados se identificaron como Gram positivos (74), Gram negativos (28) u hongos (3). Los organismos también se clasificaron como aerobios (95) o anaerobios (10).

Dos (2) o más réplicas de cada cepa se probaron con unidades McFarland de 1,7 – 3,2. Bajo las condiciones del estudio, todas las cepas dieron negativas para MRSA y SA, y ninguna fue detectada por el Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI. Se incluyeron en el estudio controles positivos y negativos. La especificidad analítica fue del 100%.

Evaluación de las cepas BORSA

Se analizaron siete (7) cepas BORSA de *Staphylococcus aureus* resistentes a la oxacilina bien caracterizas y limítrofes, incluyendo un "casete vacío" aparente (ver más arriba). El *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina es resistente a todos los medicamentos betalactámicos mediante la proteína alternativa fijadora de penicilina PBP2a codificada por *mecA*[15]. Las cepas BORSA son *mecA* negativas, pero muestran una concentración inhibidora mínima (MIC) de la oxacilina de ≥ 2 y ≤ 8 µg/ml. Esto es especialmente útil para diferenciar el MRSA del BORSA, con el fin de evitar el uso innecesario e inadecuado de vancomicina y de precauciones de aislamiento no garantizadas para pacientes infectados con una cepas sensibles a betalactámicos[16].

Bajo las condiciones de este estudio, las 7 cepas BORSA (incluida la cepa de "casete vacío" aparente) demostraron ser MRSA negativas/SA positivas tanto en las concentraciones altas y bajas de células con el Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI. No se detectaron señales de *mecA*. Estos resultados demuestran que el Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI es capaz de identificar correctamente la cepa BORSA como MRSA negativa/SA positiva y que no arrojará un resultado MRSA falso positivo.

Sensibilidad analítica

Estudios de límite de detección

Se han llevado a cabo estudios para determinar el intervalo de confianza del 95% del límite de detección (LoD) analítico de células de *Staphylococcus aureus* (SA) y células de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) diluidas en una matriz simuladora de heridas de origen humano. La matriz simuladora de heridas se componía de un concentrado de leucocitos preparado a partir de sangre total por centrifugación. La matriz también contenía glóbulos rojos y plasma, y una cantidad apenas apreciable de anticoagulante (CPD o CPDA-1). El límite de detección se define como el número más bajo de unidades formadoras de colonias (UFC) por muestra que puede distinguirse, de forma reproducible, a partir de muestras negativas con un 95% de confianza o la concentración más baja a la que 19 de 20 réplicas sean positivas.

Para MRSA, se analizaron réplicas de 20 en cada concentración de MRSA estudiada (UFC/hisopo) para 6 cepas individuales representativas de los tipos I, II, III, IVa, V y VI del SCC*mec*. Al caracterizarse con gel de electroforesis de campo pulsado (PFGE), se representaron USA100, la cepa más común adquirida en hospital, y USA400, una de las cepas más comunes adquiridas en la comunidad.

Para SA, se analizaron réplicas de 20 en cada concentración de SA (UFC/hisopo) para 3 cepas individuales de SA. Se representaron los tipos USA900 y USA1200.

Los niveles de estimación y confianza se determinaron mediante una regresión logística con datos (número de resultados positivos por número de réplicas en cada nivel) tomados en todo el intervalo de UFC/hisopo analizados. Los intervalos de confianza se determinaron con estimaciones de probabilidad máxima según los parámetros del modelo logístico, utilizando la matriz de varianza-covarianza de muestras de gran tamaño. Las estimaciones puntuales del LD y los intervalos de confianza superior e inferior del 95% para cada SA y cada tipo SCC*mec* de SARM analizados se resumen en las tablas 8 y 9.

Tabla 8. Intervalos de confianza del 95% para LoD analítico: SA

Id. de cepa de SA	PFGE	LoD (UFC/hisopo)	Inferior 95% IC	Superior 95% IC
N7129	USA900	51	42	69
102-04	USA1200	87	76	109
29213	desconocido	123	97	188

Tabla 9. Intervalos de confianza del 95% para LoD analítico: MRSA

Id. de cepa de MRSA	SCC*mec* Tipo	PFGE	LoD (UFC/hisopo)	Inferior 95% IC	Superior 95% IC
64/4176	I	USA500	221	195	271
N315	II	USA100	122	106	152
11373	III	desconocido	124	115	155
MW2	IVa	USA400	82	68	113
ST59-MRSA-V	V	USA1000	242	208	305
HDE288	VI	USA800	183	161	223

Los resultados de este estudio indican que el Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI arrojará un resultado positivo de SA el 95% de las veces con una confianza del 95% para un hisopo de herida que contenga 150 UFC, y un resultado positivo de MRSA el 95% de las veces con una confianza del 95% para un hisopo de herida que contenga 300 UFC.

Se analizaron ciento veintiuna (121) cepas adicionales de *Staphylococcus aureus* con el Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI. Se dejaron crecer los cultivos durante toda la noche en un medio de infusión de cerebro y corazón, y se ajustaron a 0,5 unidades McFarland. Todas las cepas se evaluaron por triplicado utilizando 100 µl de cultivos que luego se diluyeron entre 100.000 y un millón de veces.

Se seleccionaron 78 cepas de MRSA y 43 de SA para representar el amplio intervalo de diversidad genética típico de la especie *Staphylococcus aureus* en lo que se refiere a estructura filogenética. Las selecciones representan los principales linajes, con un énfasis especial en los complejos clonales específicos predominantes en el MRSA. Se incluyeron linajes que contenían MRSA y SA, y también linajes que sólo contenían SA.

El Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI identificó correctamente 116 de 121 cepas. Las cinco cepas discordantes estaban caracterizadas por catalasa, coagulasa en tubo y tinción de Gram. Se analizó la resistencia a la oxacilina mediada por el gen *MecA* utilizando una prueba de difusión de disco con un disco de 30 µg de cefoxitina y un límite de diámetro de 21/22 mm.

Tres (3) de las 78 cepas de MRSA demostraron ser MRSA negativas/SA positivas en el Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI. Caracterizaciones adicionales indican que estas cepas no son resistentes y que, por tanto, eran correctamente clasificadas como MRSA negativas; SA positivas.

Dos (2) de las 43 cepas de SA demostraron ser MRSA positivas/SA negativas en el Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI. Caracterizaciones adicionales indican que estas cepas son resistentes y que, por tanto, eran correctamente clasificadas como MRSA positivas; SA negativas.

Cada una de las 12 cepas de USA300 conocidas aparecían correctamente clasificadas como MRSA positivas; SA negativas, tal y como se esperaba.

Evaluación de variantes de casete vacío

Se analizaron veintidós (22) cepas de *Staphylococcus aureus* identificadas como "variantes de casete vacío" utilizando el Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI. Los cultivos se dejaron crecer toda una noche y se ajustaron a 0,5 unidades McFarland. Todas las cepas de los cultivos analizados se diluyeron después 100 veces (alta) y 100.000 veces (baja).

El Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI identificó correctamente todas las 22 cepas como MRSA negativas y SA positivas. En las dos concentraciones de células analizadas, sólo se encontraron Uc de *spa* y de SCC*mec*. No se detectaron Uc de *mecA*.

Estudio de contaminación por arrastre

Se realizó un estudio para demostrar que los cartuchos independientes de un solo uso GeneXpert evitan la contaminación por arrastre en muestras negativas analizadas después de muestras altamente positivas en el mismo módulo GeneXpert. El estudio se compuso de una muestra negativa procesada en el mismo módulo GeneXpert inmediatamente después de una muestra altamente positiva de MRSA (aproximadamente 10^7 UFC/prueba). Esto se repitió 20 veces entre dos módulos GeneXpert, hasta un total de 42 experimentos. No se encontraron pruebas de contaminación por arrastre. Las 21 muestras positivas aparecieron correctamente clasificadas como MRSA positivas/SA positivas. Las 21 muestras negativas aparecieron correctamente clasificadas como MRSA negativas/SA negativas.

Reproducibilidad

Se analizó un panel de 10 muestras con distintas concentraciones de SA, MRSA y *Staphylococcus epidermidis* (negativo) por duplicado en 10 días distintos en cada uno de los tres centros (10 muestras × 2 veces / día × 10 días × 3 centros). Se usó un lote de kits Xpert MRSA/SA en cada uno de los tres centros de prueba. El Ensayo Xpert MRSA/SA se realizó siguiendo el procedimiento de Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI.

Tabla 10. Resumen de los resultados de reproducibilidad

Id. de muestra	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Correspondencia total
Neg (MSSE)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
SA Neg Alto	100% (20/20)	100% (20/20)	90% (18/20)	96,7% (58/60)
SA Pos Bajo	100% (20/20)	100% (20/20)	95% (19/20)	98,3% (59/60)
MRSA1 Neg Alto	100% (20/20)	90% (18/20)	100% (20/20)	96,6% (58/60)
MRSA1 Pos Bajo	100% (20/20)	100% (20/20)	90% (18/20)	96.6% (58/60)
MRSA2 Neg Alto	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
MRSA2 Pos bajo	100% (20/20)	95% (19/20)	95% (19/20)	96.6% (58/60)
% de correspondencia total por centro	100% (140/140)	97.9% (137/140)	95.7% (134/140)	97.9% (411/420)

Tabla 11. Resumen de resultados de valores de Uc por nivel de muestra y sonda

CPM			
Nivel	**Media**	**Desv. estándar**	**% CV**
MRSA1 Neg Alto	34,52	0,82	2,36
MRSA2 Neg Alto	34,46	0,85	2,46
Neg (MSSE)	34,44	0,90	2,62
SA Neg Alto	34,38	0,92	2,66
Spa			
Nivel	**Media**	**Desv. estándar**	**% CV**
MRSA1 Pos Bajo	32,96	0,8	2,44
MRSA2 Pos bajo	31,05	0,69	2,21
SA Pos Bajo	33,91	0,8	2,35
mecA			
Nivel	**Media**	**Desv. estándar**	**% CV**
MRSA1 Pos Bajo	33,25	0,80	2,40
MRSA2 Pos bajo	31,50	0,68	2,16
SCC*mec*			
Nivel	**Media**	**Desv. estándar**	**% CV**
MRSA1 Pos Bajo	34,19	0,90	2,63
MRSA2 Pos bajo	33,13	0,68	2,05

Se realizó un segundo estudio de reproducibilidad con un panel de 4 muestras de (SA: 10X LoD, MRSA1: 10X LoD, MRSA2: 10X LoD, y control negativo: *Staphylococcus epidermidis*). Los paneles se analizaron por duplicado en 10 días diferentes en cada uno de los tres centros (4 muestras x 2 veces / día x 10 días x 3 centros). Se usó un lote de Ensayos Xpert MRSA/SA SSTI en cada uno de los tres centros de prueba. Los Ensayos Xpert MRSA/SA SSTI se realizaron siguiendo el procedimiento de Ensayo Xpert MRSA/SA SSTI. Se obtuvieron resultados correctos en 239 de las 240 pruebas.

Tabla 12. Resumen de los resultados de reproducibilidad

Id. de muestra	Centro 1	Centro 2	Centro 3	Correspondencia total
Neg (MSSE)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
SA Pos Moderado[1]	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
MRSA1 Pos Moderado[1]	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
MRSA2 Pos Moderado[1]	100% (20/20)	100% (20/20)	95% (19/20)	98,3% (59/60)
% de correspondencia total por centro	100% (80/80)	100% (80/80)	98,8% (79/80)	99,6% (239/240)

[1] 10X LoD

Tabla 13. Resumen de resultados de valores de Uc por nivel de muestra y sonda

CPM			
Nivel	**Media**	**Desv. estándar**	**% CV**
MRSA1 Pos Moderado	35,72	1,87	5,24
MRSA2 Pos Moderado	36,29	2,66	7,34
SA Pos Moderado	34,55	1,19	3,44
NEG	34,45	1,06	3,09
Spa			
Nivel	**Media**	**Desv. estándar**	**% CV**
MRSA1 Pos Moderado	29,52	1,30	4,40
MRSA2 Pos Moderado	28,91	1,03	3,57
SA Pos Moderado	30,59	0,91	2,99
mecA			
Nivel	**Media**	**Desv. estándar**	**% CV**
MRSA1 Pos Moderado	29,78	1,28	4,29
MRSA2 Pos Moderado	29,32	1,24	4,22
SCC*mec*			
Nivel	**Media**	**Desv. estándar**	**% CV**
MRSA1 Pos Moderado	31,49	1,26	3,99
MRSA2 Pos Moderado	31,05	1,12	3,59

Bibliografía

1. Bannerman TL. 2003 Capítulo 28: Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci that Grow Aerobically. Manual of clinical microbiology, 8ª ed. ASM Press Washington, DC. Páginas 384-404.
2. Mainous AG, Hueston WJ, Everett, et al. 2006. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *S aureus* in the United States, 2001-2002. An Family Medicine. 4(2):132-137.
3. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, resumen de datos de enero de 1992 a junio de 2004, publicado en octubre de 2004. Am J Infect Control 2004;32:470-85.
4. Chaix C, Durand-Zileski I, Alberti C, Buisson B. 1999. Control of Endemic Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. JAMA 282(19):1745-51.
5. Shopsin B, Kreiswirth BN. 2001. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Emerging Infectious Diseases 7(2) 323-6.
6. Salgado CD et al. 2003. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Meta-analysis of Prevalence and Risk Factors. CID 36:131.
7. Donnio, P-Y, Février F, Bifani P, et al. 2007. Molecular and epidemiological evidence for the spread of multiresistant methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains in hospitals. Antimicrobial. Agents Chemother. 51: 4342 – 4350.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY y McKinney RW (eds.) (1993). HHS Número de publicación (CDC) 93-8395.
9. Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (anteriormente denominado Comité Nacional de Estándares Clínicos y de Laboratorio). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (consultar la última edición).
10. Ewig S, Schlochtermeier M, Göke N, et al. 2002. Applying sputum as a diagnostic tool in pneumonia: limited yield, minimal impact on treatment decisions. Chest. 121:1486-1492.
11. RG Dotson y SK Pingleton. 1993. The effect of antibiotic therapy on recovery of intracellular bacteria from bronchoalveolar lavage in suspected ventilator-associated nosocomial pneumonia. Chest. 103, 541-546.
12. Souweine B, Veber B, Bedos JP, et al. 1998. Diagnostic accuracy of protected specimen brush and bronchoalveolar lavage in nosocomial pneumonia: impact of previous antimicrobial treatments. Crit Care Med. Feb;26(2):236-244.
13. Kanegaye JT, Soliemanzadeh P, Bradley JS, et al. 2001. Lumbar puncture in pediatric bacterial meningitis: defining the time interval for recovery of cerebrospinal fluid pathogens after parenteral antibiotic pretreatment. Pediatrics. 108(5):1169-1174.
14. Brook I, Gober A. 2005. Effects of amoxicillin and cefdinir on nasopharyngeal bacterial flora. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. Sep;131:785-787.
15. Nadarajah J, et. al., Identification of different clonal complexes and diverse amino acid substitutions in penicillin-binding protein 2 (PBP2) associated with borderline oxacillin resistance in Canadian *Staphylococcus aureus* isolates. J of Med Micro (2006), 55: 1675-1683.
16. Ribeiro J, et. al., Misclassification of Susceptible Strains of *Staphylococcus aureus* as Methicillin-Resistant *S. aureus* by a rapid Automated Susceptibility Testing System. (1999), 37: 1619-1620.

Asistencia

Si desea obtener asistencia, póngase en contacto con Cepheid. No olvide facilitar el número de serie del instrumento y el Id. del lote de reactivos si realiza una llamada o envía un correo electrónico.

Unión Europea

Para acceder al servicio técnico, utilice los siguientes datos de contacto:

Tel: +33.563.82.53.19

Correo electrónico: techsupport@cepheideurope.fr

Otras oficinas

Póngase en contacto con su representante local de Cepheid.

Tabla de símbolos

Símbolo	Significado
REF	Número de referencia
IVD	Producto sanitario para diagnóstico *in vitro*
	No reutilizar
LOT	Código de lote
	Precaución, consultar el documento adjunto
	Fabricante
	Contiene cantidad suficiente para <n> pruebas
	Fecha de caducidad
CONTROL	Control
EC REP	Representante autorizado en la Comunidad Europea
CE	Marca CE – Comunidad Europea
	Límite de temperatura
	Riesgos biológicos

Cepheid AB
Röntgenvägen 5
SE-171 54 Solna
Suecia

Producto de Suecia

EC REP

Cepheid Europa
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
Francia

Tel.: +33.563.82.53.00
Fax: +33.563.82.53.01
Correo electrónico: cepheid@cepheideurope.fr

CE IVD

Italiano

Solo per uso diagnostico *in vitro*

Nome registrato

Xpert® MRSA/SA SSTI

Nome comune o usuale

Saggio MRSA/SA SSTI

Uso previsto

Il saggio Cepheid Xpert MRSA/SA per le infezioni della cute e dei tessuti molli (saggio Xpert MRSA/SA SSTI), eseguito su GeneXpert® Dx System, è un test diagnostico *in vitro* qualitativo, progettato per il rilevamento dello *Staphylococcus aureus* (SA) e dello *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA) da campioni di infezioni della cute e dei tessuti molli. Il test utilizza la PCR (Polymerase Chain Reaction, reazione a catena della polimerasi) real time automatizzata per rilevare il DNA dell'MRSA/SA. Il saggio Xpert MRSA/SA SSTI è indicato per l'utilizzo in associazione ad altri test di laboratorio quali colture microbiologiche, e ai dati clinici a disposizione del medico come ausilio per il rilevamento dell'MRSA/SA dalle infezioni della cute e dei tessuti molli. Il saggio Xpert MRSA/SA SSTI non è destinato al monitoraggio del trattamento delle infezioni da MRSA/SA. Le colture concomitanti per SA e MRSA sono necessarie per recuperare gli organismi per test di sensibilità o per la tipizzazione epidemiologica.

Riepilogo e spiegazione

Lo *Staphylococcus aureus* (SA) è un patogeno opportunistico dell'uomo ben noto ed anche un importante patogeno nosocomiale causa di diverse malattie. Alcune malattie coinvolgono le infezioni della cute e dei tessuti molli, tra cui carbonchio cutaneo e foruncoli, e le infezione da ferite post-chirurgiche di diversi siti. Come patogeno nosocomiale, lo *S. aureus* ha rappresentato una causa rilevante di morbidità e mortalità. Le infezioni da *S. aureus* sono spesso acute e purulente e, se non trattate, possono diffondersi ai tessuti circostanti o tramite batteriemia, ai siti metastatici (coinvolgendo altri organi). Tra le infezioni più gravi causate dallo *S. aureus* vi sono batteriemia, polmonite, osteomielite, endocardite acuta, sindrome da shock tossico, intossicazione alimentare, miocardite, pericardite, encefalite, meningite, corioamnionite, necrolisi epidermica tossica, ascessi muscolari, del tratto urogenitale, del sistema nervoso centrale e di vari organi intra-addominali[1].

All'inizio degli anni Cinquanta, l'acquisizione e la diffusione dei plasmidi che producono la beta-lattamasi contrastavano l'efficacia della penicillina per il trattamento delle infezioni da *S. aureus*. Nel 1959, fu introdotta la meticillina, una penicillina sintetica. Tuttavia, nel 1960, i ceppi di *S. aureus* meticillino-resistenti erano stati identificati. È stato determinato che ciò è il risultato dell'acquisizione del gene *mecA* da parte dello *S. aureus*. Attualmente, negli Stati Uniti, l'MRSA è responsabile di circa il 25% delle infezioni nosocomiali e i casi riportati di MRSA contratto in comunità sono in aumento, determinando morbidità e mortalità significative. La percentuale della mortalità riportata, attribuibile alle batteriemie da MRSA e *S. aureus* (SA) sensibile alla meticillina, è rispettivamente del 33% e del 16%. A ciò si aggiungono le aumentate preoccupazioni relative ai costi per il trattamento delle infezioni da MRSA. Nel tentativo di limitare la diffusione di queste infezioni, si stanno mettendo a punto e realizzando strategie e politiche di controllo negli ambienti sanitari. Il controllo dell'MRSA è l'obiettivo principale della maggior parte dei programmi di controllo delle infezioni nosocomiali. Attualmente, il metodo di rilevamento standard per l'MRSA e l'SA è la coltura, che è molto laboriosa e può richiedere diversi giorni prima di produrre un risultato definitivo.[2,3,4,5,6,7]

Principio della procedura

Il sistema GeneXpert Dx consente di automatizzare e integrare la purificazione dei campioni, l'amplificazione degli acidi nucleici e il rilevamento della sequenza bersaglio in campioni semplici e complessi utilizzando saggi PCR in tempo reale. Il sistema è composto da uno strumento, un personal computer e dal software già installato per l'esecuzione di analisi e per la visualizzazione dei risultati. Il sistema richiede l'uso di cartucce monouso, nelle cartucce sono contenuti i reagenti per la PCR e sempre nella cartuccia avviene la reazione di PCR. Poiché le cartucce sono indipendenti, il rischio di contaminazione crociata tra campioni è ridotto al minimo. Per una descrizione completa del sistema, vedere il *Manuale dell'operatore di GeneXpert Dx System*.

Il saggio Xpert MRSA/SA SSTI include reagenti per il rilevamento dell'MRSA e dell'SA e un controllo elaborazione del campione (SPC) per controllare l'adeguatezza l'adeguatezza del processamento dei batteri bersaglio dei batteri bersaglio e per monitorare la presenza di inibitori nella reazione PCR. L'SPC garantisce inoltre che le condizioni della reazione PCR (temperatura e durata) siano adatte alla reazione di amplificazione, e che i reagenti PCR siano funzionali. Il controllo per il controllo sonda (PCC) verifica la reidratazione dei reagenti, il riempimento della provetta PCR nella cartuccia, l'integrità della sonda e la stabilità del dye.

I primer e le sonde nel saggio Xpert MRSA/SA SSTI rilevano sequenze brevettate per la proteina A stafilococcica (*spa*), il gene per la resistenza alla meticillina (*mecA*) e il cromosoma nella cassetta stafilococcica (SCC*mec*) inserito nel sito *attB* cromosomico dell'SA.

Reagenti e strumenti

Materiale fornito

Il kit del saggio Xpert MRSA/SA SSTI contiene reagenti sufficienti per elaborare 10 campioni o campioni di controllo qualità. Il kit contiene il seguente materiale:

Cartucce del saggio Xpert MRSA/SA SSTI con provette di reazione integrate	**10**
Microsfere 1, 2, e 3 (liofilizzate)	**1 per cartuccia**
Reagente 1 del saggio Xpert MRSA/SA SSTI	**2,8 ml per cartuccia**
Reagente 2 del saggio Xpert MRSA/SA SSTI	**3,2 ml per cartuccia**
Reagente di eluizione del saggio Xpert MRSA/SA SSTI	**10**
Reagente di eluizione (tiocianato di guanidinio)	**1 x 2,0 ml per busta**
CD	**1 per kit**
File di Definizione del Saggio (ADF)	
Istruzioni per importare ADF in sistema GX	
Foglietto illustrativo	

Notas:

- Le schede dati di sicurezza (SDS) sono disponibili nei siti www.cepheid.com/tests-and-reagents/literature/msds o www.cepheidinternational.com/tests-and-reagents/literature/msds.
- L'albumina di siero bovino (BSA) nelle microsfere di questo prodotto è stata prodotta esclusivamente da plasma bovino di origine statunitense. Anche la produzione della BSA viene eseguita negli Stati Uniti. Gli animali non sono stati nutriti con proteine bovine o altre proteine animali; gli animali hanno superato i test ante mortem e post mortem. Durante l'elaborazione, il materiale non è stato miscelato con altro materiale animale.

Conservazione e manipolazione

- Conservare le cartucce e i reagenti del saggio Xpert MRSA/SA SSTI a una temperatura di 2 – 28 °C.
- Non utilizzare reagenti o cartucce oltre la data di scadenza.
- Non aprire una cartuccia finché non si è pronti per eseguire l'analisi.
- Utilizzare la cartuccia e i reagenti entro 30 minuti dall'apertura del coperchio della cartuccia.
- Non utilizzare reagenti diventati torbidi o che presentino una colorazione alterata.

Materiali necessari ma non forniti

- GeneXpert Dx System (il numero di catalogo varia in base alla configurazione) Strumento GeneXpert, computer, lettore di codici a barre a penna e manuale dell'operatore
- Stampante (per le linee guida sulla compatibilità, consultare il *Manuale dell'operatore di GeneXpert Dx System*)
- Dispositivo di raccolta del campione Cepheid (900-0370) o equivalente Copan
- Miscelatore vortex
- Pipette di trasferimento monouso
- Garza sterile

Materiali necessari ma non forniti

KWIK-STIKs™ dal catalogo MicroBiologics n. 0158MRSA e n. 0360SA come controlli positivi e n. 0371MSSE (*Staphylococcus epidermidis* sensibile alla meticillina) come controllo negativo.

Avvertenze e precauzioni

- Tutti i campioni biologici di analisi, comprese le cartucce usate, devono essere trattati come potenziali veicoli di agenti infettivi. Poiché è spesso impossibile sapere quale campione potrebbe essere infetto, tutti i campioni biologici di analisi devono essere trattati adottando le precauzioni standard. Le linee guida per la manipolazione dei campioni sono disponibili presso gli U.S. Center for Disease Control and Prevention[8], e il Clinical and Laboratory Standards Institute (in precedenza denominato National Committee for Clinical Laboratory Standards).[9]

  In una coltura mista contenente MRSA/SA ed altri organismi (es. bacilli Gram-negativi, lieviti), i risultati possono essere falsi negativi o variabili a seconda della concentrazione di MRSA/SA presente, in particolare se tale concentrazione è prossima al LoD del saggio.

- Attenersi alle procedure di sicurezza del proprio istituto relative alla manipolazione di sostanze chimiche e di campioni biologici.
- Il saggio Xpert MRSA/SA SSTI riesce a rilevare DNA di MRSA e/o SA da organismi non vitali. La probabilità che ciò si verifichi aumenta nei pazienti trattati con antibiotici.
- Il saggio Xpert MRSA/SA SSTI non fornisce risultati sui test di sensibilità antimicrobica. È necessario ulteriore tempo per eseguire la coltura e il test di sensibilità.
- Non sostituire il reagente del saggio Xpert MRSA/SA SSTI con altri reagenti.
- Non aprire il coperchio della cartuccia del saggio Xpert MRSA/SA SSTI se non per l'aggiunta di campioni e reagenti o per la ripetizione del test.
- Non utilizzare le cartucce dopo averle fatte cadere o agitate in seguito all'aggiunta di campioni e reagenti.
- Non utilizzare una cartuccia con una provetta di reazione danneggiata.

- Ciascuna cartuccia monouso del saggio Xpert MRSA/SA SSTI è utilizzata per elaborare un'analisi. Non riutilizzare le cartucce usate.
- Consultare il personale addetto allo smaltimento dei rifiuti ambientali del proprio istituto per il corretto smaltimento delle cartucce usate e dei reagenti non utilizzati. Questo materiale può rientrare tra i rifiuti pericolosi in base alla normativa stabilita dalla EPA Resource Conservation and Recovery Act (RCRA) e richiedere requisiti di smaltimento specifici. Controllare le normative regionali e locali che possono differire dalla normativa nazionale sullo smaltimento. Gli istituti al di fuori degli USA devono controllare le normative sullo smaltimento dei rifiuti pericolosi del proprio paese.

- Conservare il kit del saggio Xpert MRSA/SA SSTI a una temperatura di 2 – 28 °C.
- Aprire il coperchio della cartuccia solo immediatamente prima di eseguire il test.

- Il reagente di eluizione contiene guanidina tiocianato (H402, EUH301), sostanza pericolosa per gli organismi acquatici e che a contatto con gli acidi sprigiona gas tossici.

- Il reagente 2 contiene idrossido di sodio (H314), sostanza corrosiva per gli occhi e la pelle che richiede l'impiego di apposite protezioni.

Raccolta, trasporto e conservazione del campione

I campioni dei tamponi di infezioni della cute e dei tessuti molli possono essere prelevati con il dispositivo di raccolta del campione Cepheid attenendosi alle procedure standard del proprio istituto. I tamponi dei campioni vengono quindi riposti nella provetta di trasporto blu (si consigliano liquido Stuart, dispositivo di raccolta del campione Cepheid o Copan), conservati a temperatura ambiente e inviati all'area di analisi GeneXpert per l'elaborazione entro il giorno successivo. I restanti campioni non analizzati dei tamponi per le colture microbiologiche devono essere posti in sistemi di trasporto adeguati e la coltura allestita entro 4 giorni. Se non inviato entro il giorno seguente, il campione deve essere trasportato nel ghiaccio. In alternativa, è possibile conservare i tamponi a 2 – 8 °C per analisi fino a 5 giorni.

Colture microbiologiche

Per i metodi di coltura dell'SSTI, seguire le procedure operative standard di laboratorio in vigore. Per le colture, i campioni dei tamponi rimasti devono essere posti in sistemi di trasporto adeguati e la coltura allestita entro 4 giorni.

Procedura

Preparazione della cartuccia

Importante: Avviare l'analisi entro 15 minuti dall'aggiunta dei reagenti nella cartuccia.

Per aggiungere il campione e il reagente nella cartuccia:

1. Estrarre la cartuccia e il reagente dalla confezione.
2. Rimuovere il tampone marcato dal contenitore di trasporto.

Nota: Utilizzare una garza sterile per ridurre al minimo il rischio di contaminazione durante la manipolazione del campione.

3. Inserire il tampone nella provetta che contiene il reagente di eluizione e spezzare il tampone.
4. Chiudere il coperchio del flacone di eluizione e vortexare ad alta velocità per 10 secondi.
5. Aprire il coperchio della cartuccia. Utilizzando una pipetta di trasferimento sterile, trasferire tutto il contenuto del reagente di eluizione nella camera "S" della cartuccia del saggio Xpert MRSA/SA SSTI.
6. Chiudere il coperchio della cartuccia.

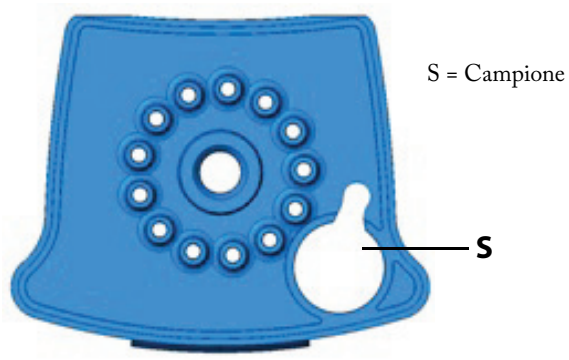

Figura 1. Cartuccia del saggio Xpert MRSA/SA SSTI (vista superiore)

Avvio dell'analisi

Importante: Prima di avviare l'analisi, accertarsi che il file di definizione del saggio Xpert MRSA/SA SSTI sia importato nel software.

Questa sezione elenca i passaggi di base per l'esecuzione dell'analisi. Per istruzioni dettagliate, vedere il *Manuale dell'operatore di GeneXpert Dx System*.

1. Accendere lo strumento GeneXpert Dx e successivamente il computer; il software GeneXpert si avvia automaticamente.
2. Connettersi al software di GeneXpert Dx System con il proprio nome utente e la password.
3. Nella finestra **GeneXpert Dx System**, fare clic su **Create Test** (**Crea analisi**). Verrà visualizzata la finestra di dialogo **Scan Cartridge Barcode** (**Analizza codice a barre cartuccia**).
4. Eseguire la scansione del codice a barre sulla cartuccia del saggio Xpert MRSA/SA SSTI. Verrà visualizzata la finestra **Create Test** (**Crea analisi**). Utilizzando le informazioni del codice a barre, il software completa automaticamente le caselle dei campi seguenti: Select Assay (Seleziona saggio), Reagent Lot ID (ID lotto reagenti), Cartridge SN (Cartuccia SN) ed Expiration Date (Data di scadenza).
5. Nella casella **Sample ID** (**ID campione**), eseguire la scansione o digitare l'ID del campione. Accertarsi di digitare correttamente l'ID del campione. L'ID del campione è associato ai risultati dell'analisi ed è mostrato nella finestra **View Results (Visualizza risultati)** e in tutte le relazioni.
6. Fare clic su **Start Test** (**Avvia analisi**) Nella finestra di dialogo visualizzata, digitare la password.
7. Aprire lo sportello del modulo dello strumento con la spia verde lampeggiante e caricare la cartuccia.
8. Chiudere lo sportello. L'analisi viene avviata e la spia verde cessa di lampeggiare. Al termine dell'analisi, la spia si spegne.
9. Attendere che il sistema sblocchi il meccanismo di chiusura dello sportello prima di aprire lo sportello del modulo e rimuovere la cartuccia.
10. Le cartucce utilizzate devono essere smaltite negli appositi contenitori per rifiuti in base alle pratiche standard dell'istituto.

Visualizzazione e stampa dei risultati

Per istruzioni su come visualizzare e stampare i risultati, vedere il *Manuale dell'operatore del sistema GeneXpert*.

CONTROL

Controllo di qualità

Controlli di qualità integrati

Ciascuna analisi include un controllo elaborazione del campione (SPCo BG3 nella schermata di visualizzazione dei risultati per l'utente di livello amministratore) e un controllo per il controllo sonda (PCC).

- **Sample processing control (SPC)** (Controllo elaborazione del campione): assicura la corretta elaborazione del campione. L'SPC contiene le spore del *Bacillus globigii* sotto forma di una tavoletta di spore secche in ogni cartuccia per verificare che l'elaborazione del campione del saggio Xpert MRSA/SA SSTI sia adeguata. L'SPC verifica che sia avvenuta la lisi dello *Staphylococcus aureus* se gli organismi sono presenti e verifica l'adeguatezza dell'elaborazione del campione. Inoltre, questo controllo rileva l'inibizione associata al campione del saggio PCR in tempo reale, garantisce che le condizioni di reazione PCR (temperatura e tempo) siano adeguate alla reazione di amplificazione, e che i reagenti PCR siano funzionali. L'SPC deve essere positivo in un campione negativo e può essere negativo o positivo in un campione positivo. L'SPC viene superato, se soddisfa i criteri di accettazione validati.
- **Probe Check Control (PCC)** (Controllo per il controllo sonda): prima dell'avvio della reazione PCR, GeneXpert Dx System misura il segnale di fluorescenza dalle sonde per monitorare la reidratazione delle microsfere, il riempimento della provetta di reazione, l'integrità della sonda e la stabilità del dye. Il controllo sonda viene superato se soddisfa i criteri di accettazione assegnati.

Controlli esterni

- KWIK-STIKs (MicroBioLogics, numero di catalogo 0158MRSA [SCC*mec* tipo II] e 0360SA come controlli positivi e 0371MSSE come controllo negativo) possono essere usati per addestramento, test di competenza e controllo qualità esterno di GeneXpert Dx System. I ceppi MRSA che rappresentano tipi SCC*mec*, se disponibili, possono essere utilizzato come controlli positivi esterni aggiuntivi per il monitoraggio dei primer del saggio e delle sonde non direttamente controllate nel saggio. I controlli esterni possono essere utilizzati in accordo con gli istituti di accreditamento e le normative governative, se applicabile. Attenersi alla procedura per il controllo esterno MicroBioLogics descritta di seguito:
  1. Strappare a livello della tacca per aprire la busta e rimuovere il KWIK-STIK.
  2. Premere la parte inferiore dell'ampolla nel tappo per rilasciare il liquido idratante.
  3. Tenere in posizione verticale e picchiettare delicatamente per facilitare il flusso del liquido attraverso il collo nella parte inferiore dell'unità che contiene il pellet.
  4. Per facilitare la risospensione del pellet di cellule liofilizzato, schiacciare il pellet e premere delicatamente la parte inferiore della camera.
  5. Staccare il KWIK-STIK per rilasciare il tampone e inserire quest'ultimo nella provetta che contiene il reagente di eluizione (tappo a vite).
  6. Il tampone KWIK-STIK è pronto per il test del saggio Xpert MRSA/SA SSTI.
  7. Se il CQ esterno non funziona secondo le previsioni, ripetere il test di controllo esterno e/o contattare Cepheid per l'assistenza.

Alcuni esempi dei risultati del saggio Xpert MRSA/SA SSTI sono illustrati nelle figure da 2 a 5.

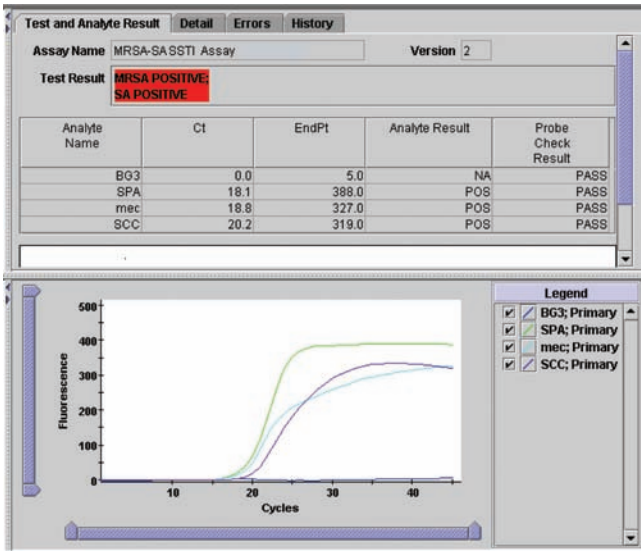

Figura 2. Esempio di un risultato MRSA positivo e SA positivo

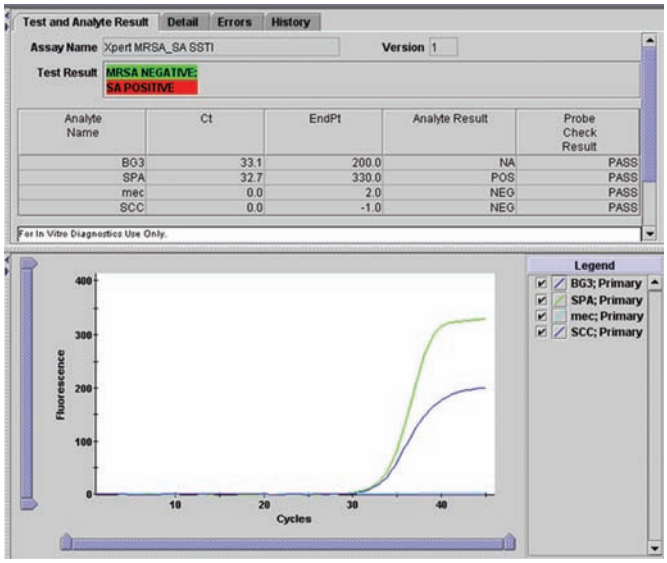

Figura 3. Esempio di un risultato MRSA negativo e SA positivo

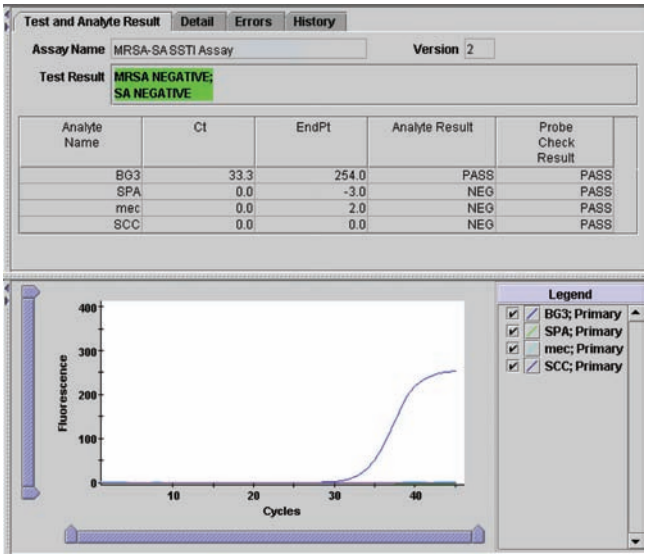

Figura 4. Esempio di un risultato MRSA negativo e SA negativo

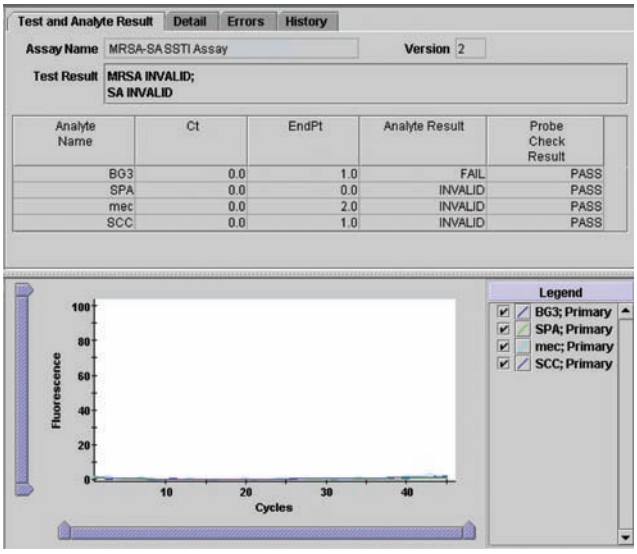

Figura 5. Esempio di un risultato non valido

Interpretazione dei risultati

I risultati sono interpolati da GeneXpert Dx System a partire dai segnali di fluorescenza misurati e dagli algoritmi di calcolo predefiniti e sono visualizzati nella finestra **View Results** (**Visualizza risultati**). I risultati possibili sono:

MRSA POSITIVE/SA POSITIVE (MRSA POSITIVO/SA POSITIVO)
Il saggio Xpert MRSA/SA SSTI riesce a rilevare DNA di MRSA e/o SA da organismi non vitali.

Vengono rilevate le sequenze del DNA bersaglio di MRSA/viene rilevata la sequenza del DNA bersaglio di SA.

- MRSA POSITIVE — tutti i bersagli di MRSA (*spa*, *mecA* and SCC*mec*) hanno una soglia del ciclo (Ct) dentro l'intervallo valido e un punto finale al di sopra dell'impostazione del valore minimo.
- SPC — NA (non applicabile): l'SPC viene ignorato, poiché l'amplificazione MRSA può competere con questo controllo.
- Probe Check — PASS: tutti i risultati del controllo sonda sono superati.

MRSA NEGATIVE/SA POSITIVE (MRSA NEGATIVO/SA POSITIVO)
Il saggio Xpert MRSA/SA SSTI riesce a rilevare DNA di MRSA e/o SA da organismi non vitali.

- Non vengono rilevate le sequenze del DNA bersaglio di MRSA/viene rilevata la sequenza del DNA bersaglio di SA.
- SA POSITIVE — il bersaglio di SA (*spa*) ha un valore Ct compreso nell'intervallo valido e un valore finale sopra l'impostazione del valore minimo. Il DNA bersaglio per SCC*mec* non viene rilevato, il DNA bersaglio per *mecA* può o non può essere rilevato, oppure il DNA bersaglio per SCC*mec* viene rilevato e il DNA bersaglio per *mecA* non viene rilevato ("empty cassette", cassetta vuota).
- SPC — NA (non applicabile): l'SPC viene ignorato, poiché l'amplificazione SA può competere con questo controllo.
- Probe Check — PASS: tutti i risultati del controllo sonda sono superati.

Un risultato positivo dell'analisi non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. È tuttavia presuntivo per la presenza di MRSA o SA.

MRSA NEGATIVE/SA NEGATIVE (MRSA NEGATIVO/SA NEGATIVO)
Non viene rilevata la sequenza del DNA bersaglio di *Staphylococcus aureus*. L'SPC soddisfa i criteri di accettazione.

- NEGATIVE — non viene rilevata il DNA bersaglio (*spa*) di *Staphylococcus aureus*. Il DNA bersaglio per *mecA* può o non può essere rilevato, oppure il DNA bersaglio per SCC*mec* può o non può essere rilevato.
- SPC — PASS: l'SPC ha un valore Ct compreso nell'intervallo valido e un valore finale sopra l'impostazione del valore minimo del punto finale.
- Probe Check — PASS: tutti i risultati del controllo sonda sono superati.

Un falso negativo per MRSA (un risultato di "MRSA NEGATIVE; SA POSITIVE" anzichè "MRSA POSITIVE; SA POSITIVE") può essere ottenuto se entrambi MRSA e SA sono presenti nel campione con una proporzione MRSA:SA pari a $1:1x10^6$ o superiore.

Negli studi clinici, 5 delle 246 colture positive per MRSA presentavo infezioni miste di MRSA e SA. Xpert MRSA/SA SSTI ha identificato 3 delle 5 infezioni miste come MRSA positive e 2 delle 5 come SA positive/MRSA negative.

INVALID (NON VALIDO)
La presenza o l'assenza di sequenze di DNA bersaglio per MRSA/SA non possono essere determinate, ripetere l'analisi osservando le istruzioni riportate di seguito. L'SPC non soddisfa i criteri di accettazione, il campione non è stato elaborato correttamente o la PCR è stata inibita.

- INVALID — non può essere determinata l'assenza o la presenza del DNA di *Staphylococcus aureus*.
- SPC-FAIL — il risultato del target SPC è negativo e il valore Ct dell'SPC non rientra nell'intervallo valido e il valore finale è sotto l'impostazione del valore minimo.
- Probe Check — PASS: tutti i risultati del controllo sonda sono superati.

ERROR (ERRORE)
La presenza o l'assenza di sequenze di DNA bersaglio per MRSA/SA non possono essere determinate, ripetere l'analisi osservando le istruzioni riportate di seguito. Il controllo per il controllo sonda non è riuscito probabilmente a causa del riempimento scorretto della provetta di reazione, di un problema di integrità della sonda o perché sono stati superati i limiti della pressione massima.

- MRSA — NO RESULT
- SA — NO RESULT
- SPC — NO RESULT
- Probe Check — FAIL*; uno o più risultati del controllo sonda non riescono.

*Se il controllo della sonda è stato superato, si è verificato un errore di un componente del sistema.

NO RESULT (NESSUN RISULTATO)
La presenza o l'assenza di sequenze di DNA bersaglio per MRSA/SA non possono essere determinate, ripetere l'analisi osservando le istruzioni riportate di seguito. Sono stati raccolti dati insufficienti per produrre un risultato del test; ciò può verificarsi, per esempio, quando l'operatore ha interrotto un'analisi in corso.

- MRSA — NO RESULT
- SA — NO RESULT
- SPC — NO RESULT
- Probe Check—NA (non applicabile)

Motivi per ripetere il saggio

Ripetere l'analisi utilizzando una cartuccia nuova (non riutilizzare la cartuccia) e dei reagenti nuovi. Eseguire la procedura di ripetizione dell'analisi entro 3 ore da un risultato indeterminato.

Un risultato INVALID (NON VALIDO) indica che il controllo SPC non è riuscito. Il campione non è stato elaborato correttamente o la PCR era inibita.

Un risultato ERROR (ERRORE) indica che il controllo per il controllo sonda non è riuscito e il saggio è stato interrotto probabilmente a causa del riempimento scorretto della provetta di reazione, è stato rilevato un problema di integrità della sonda o sono stati superati i limiti della pressione massima.

Un risultato NO RESULT (NESSUN RISULTATO) indica che sono stati raccolti dati insufficienti. Per esempio, l'operatore ha interrotto un'analisi in corso.

Se il CQ esterno non funziona secondo le previsioni, ripetere il test di controllo esterno e/o contattare Cepheid per l'assistenza.

Per ripetere l'analisi:

Se l'analisi viene ripetuta entro 3 ore da un risultato incerto*:

1. Trasferire il contenuto restante dalla camera S ad un nuovo reagente di eluizione utilizzando una pipetta di trasferimento monouso.
2. Vortexare e aggiungere tutto il contenuto del reagente di eluizione nella camera S di una nuova cartuccia del saggio MRSA/SA SSTI.
3. Chiudere il coperchio e avviare una nuova analisi.

* Se non è possibile eseguire nuovamente l'analisi entro 3 ore, utilizzare un campione nuovo.

Limitazioni

Le prestazioni del saggio Xpert MRSA/SA SSTI sono state validate solo con le procedure fornite in questo foglio illustrativo. Le modifiche apportate a queste procedure possono alterare le prestazioni dell'analisi. I risultati del saggio Xpert MRSA/SA SSTI devono essere interpretati contestualmente agli altri dati clinici e di laboratorio a disposizione del medico.

Il saggio Xpert MRSA/SA SSTI riesce a rilevare DNA di MRSA e/o SA da organismi non vitali. La probabilità che ciò si verifichi aumenta nei pazienti trattati con antibiotici. Nello studio clinico cruciale, il tasso falso positivo (rispetto alla coltura) di rilevamento di SA in pazienti trattati con antibiotici, nelle 3 settimane precedenti all'analisi con Xpert MRSA/SA, era pari al 13,8%. Il tasso falso positivo (rispetto alla coltura) di rilevamento di MRSA in pazienti trattati con antibiotici, nelle 3 settimane precedenti all'analisi con Xpert MRSA/SA, era pari al 9,5%.

Un risultato positivo dell'analisi non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. È tuttavia presuntivo per la presenza di MRSA o SA.

I test con il saggio Xpert MRSA/SA SSTI devono essere utilizzati in aggiunta ad altri metodi disponibili.

Risultati errati dell'analisi potrebbero verificarsi in seguito a errori di raccolta del campione, esecuzione non corretta della procedura consigliata di raccolta del campione, manipolazione o conservazione errata, errori tecnici, scambio di campioni o presenza nel campione di un numero di organismi inferiore alla soglia di sensibilità analitica del test. Per evitare risultati errati, è necessario attenersi scrupolosamente alle istruzioni descritte in questo foglio illustrativo.

Il rilevamento dell'MRSA e dell'SA dipende dal numero di organismi presenti nel campione, pertanto l'affidabilità dei risultati dipende dalla raccolta, dalla manipolazione e dalla conservazione appropriate del campione.

Le mutazioni o i polimorfismi nelle regioni di legame dei primer e delle sonde possono influire sul rilevamento di nuove o sconosciute varianti dell'MRSA dando origine a un risultato falso negativo.

Nei campioni contenenti sia MRSA che SA, il saggio Xpert MRSA/SA SSTI potrebbe non rilevare gli organismi SA resistenti alla meticillina. (Nello studio clinico cruciale, il saggio Xpert MRSA/SA SSTI non è riuscito a rilevare 2 dei 5 campioni positivi di colture di MRSA in situazioni che presentavano infezioni miste di MRSA/SA.)

In una coltura mista, il LoD analitico dell'MRSA è variabile se sono presenti concentrazioni estremamente elevate di SA. La rivalità da SA è stata osservata ad un rapporto MRSA:SA di $1:10x10^6$. Negli studi clinici, 5 delle 246 colture positive per MRSA presentavo infezioni miste di MRSA e SA. Xpert MRSA/SA SSTI ha identificato 3 delle 5 infezioni miste come MRSA positive e 2 delle 5 come SA positive/MRSA negative.

L'inibizione del saggio MRSA/SA SSTI è stata osservata con le seguenti sostanze: StaphA $^+$Settico (5% w/v), Idrocortisone (5% w/v), e disinfettante antibatterico per le mani (5% w/v).

I campioni contenenti mercurio cromo non devono essere utilizzati a causa della natura fluorescente di quest'ultimo.

Il saggio Xpert MRSA/SA SSTI genererà un risultato MRSA falso positivo durante l'analisi di un campione SSTI da infezione mista contenente sia *Staphylococcus* coagulasi negativo resistente alla meticillina (MRCNS) che una cassetta vuota di *Staphylococcus aureus* (SA) resistente alla meticillina.

Sostanze interferenti

Nello studio sperimentale per il saggio Xpert MRSA/SA SSTI, 428 degli 848 campioni osservati contenevano sangue, e 404 contenevano sostanze non specifiche, capaci di interferire potenzialmente con il saggio (notare che alcuni campioni contenevano più di un tipo di potenziali sostanze contaminanti). I test esatti di Fischer condotti sui dati generati da campioni con e senza tali sostanze potenzialmente interferenti, hanno dimostrato che la loro presenza non ha effetti sulle prestazioni del saggio.

In uno studio non clinico, le sostanze potenzialmente interferenti che possono trovarsi nei campioni clinici di infezioni della cute e dei tessuti molli, sono state valutate direttamente in relazione alle prestazioni del saggio Xpert MRSA/SA SSTI. Le sostanze potenzialmente interferenti nelle infezioni della cute e dei tessuti molli possono includere, ma non si limitano a: sangue, pus, plasma, unguenti per uso topico (antibiotici/antisettici/analgesici), agenti di sbrigliamento e tinture. Tali sostanze sono elencate nella Tabella 1 e nella Tabella 2 con illustrati gli ingredienti attivi e le concentrazioni analizzati. L'inibizione del saggio MRSA/SA SSTI è stata osservata con le seguenti sostanze: StaphA^{+}Settico (5% w/v), Idrocortisone (5% w/v), e disinfettante antibatterico per le mani (5% w/v).

I campioni contenenti mercurio cromo non devono essere utilizzati a causa della natura fluorescente di quest'ultimo.

Tabella 1. Sostanze potenzialmente interferenti con SSTI analizzate

Sostanza	Ingrediente attivo	% analizzata
Buffer TET (controllo)	Controllo	Controllo
Buffy Coat (ferita surrogata)	Globuli bianchi (1,5e9/mL)	50% (v/v)
Sangue intero (privo di MRSA/SA)	Non applicabile	50% (v/v)
Plasma	Non applicabile	50% (v/v)
Neosporina	Bacitracina 400 unità Polimixina B 5.000 unità Neomicina 3,5 mg	1% e 5% (w/v)
StaphA^{+}Settico	0,2% Benzetonio cloruro, 2,5% Lidocaina HCI	1% e 5% (w/v)
Idrocortisone	1% Idrocortisone	1% e 5% (w/v)
Sostanze per il trattamento dei foruncoli	20% Benzocaina	1% e 5% (w/v)
Tintura di iodio	2% Iodio	50% (v/v)

Tabella 2. Sostanze potenzialmente interferenti con SSTI analizzate

Sostanza	Ingrediente attivo	% analizzata
Buffer TET (controllo)	Controllo	Controllo
Mupirocina	0,2% Benzetonio cloruro, 2,5% Lidocaina HCI	5% (v/v)
Sangue intero (privo di MRSA/SA)	Non applicabile	50% (v/v)
Soluzione salina	0,65% Cloruro di sodio	50% (v/v)
Disinfettante antibatterico per le mani	62% Alcol etilico	1% e 5% (w/v)
70% Alcol isopropilico	70% Alcol isopropilico	50% (v/v)

Valori previsti

Nello studio clinico Xpert MRSA/SA SSTI, un totali di 848 campioni SSTI sono stati inclusi da quattro grandi ospedali statunitensi. Il numero e la percentuale di casi positivo per metodo di coltura di riferimento, calcolati per gruppi di età, sono presentati in Tabella 3.

Tabella 3. Prevalenza osservata di MRSA e SA per coltura

Gruppo di età	Nr. totale	MRSA per coltura		SA per coltura	
		Numero positivo	Prevalenza osservata	Numero positivo	Prevalenza osservata
Età inferiore a 3	34	11	32,4%	21	61,8%
Età da 3 a 18	100	25	25,0%	55	55,0%
Età da 19 a 65	614	188	30,6%	300	48,9%
Età 66 e oltre	100	22	22,0%	35	35,0%

Caratteristiche sulle prestazioni

Prestazioni cliniche

Le caratteristiche sulle prestazioni del saggio Xpert MRSA/SA SSTI sono state determinate in uno studio sperimentale prospettico in più laboratori presso 4 istituti statunitensi, confrontando il saggio Xpert MRSA/SA SSTI con la coltura di riferimento. I soggetti comprendevano individui la cui cura di routine richiedeva la raccolta di un tampone dall'infezione della cute e dei tessuti molli del paziente per coltura.

Tamponi doppi sono stati raccolti da ogni soggetto. Un tampone è stato analizzato dal saggio Xpert MRSA/SA SSTI presso il centro di arruolamento, e l'altro tampone è stato analizzato con il metodo standard del sito, e il restante campione è stato inviato al laboratorio centrale per le analisi sulla coltura di riferimento.

Nel laboratorio centralizzato, il campione è stato arricchito per tutta la notte in brodo di soia triptico con NaCl al 6,5%. Il brodo di soia triptico è stato quindi strisciato su piastre con cefoxitina (per l'MRSA) e senza cefoxitina (per l'SA). Se una delle due o entrambe le piastre di SA o MRSA evidenziavano presunte colonie di *S. Aureus*, veniva eseguita una subcoltura su una piastra di agar sangue. La conferma di colonie presuntivamente positive è stata eseguita con catalasi, un test della coagulasi in provetta e colorazione di Gram. La resistenza all'oxacillina mediata da *MecA*, è stata testata con test di disco-diffusione utilizzando un disco di cefoxitina da 30 µg e un cutoff di 21/22 mm. Se le colture di entrambe le piastre di SA e MRSA risultavano negative, il brodo di soia triptica archiviato con NaCl al 6,5% veniva sottoposto a subcoltura su agar sangue con successivo workup per SA/MRSA come descritto in precedenza.

Le prestazioni del saggio Xpert MRSA/SA SSTI sono state calcolate rispetto ai risultati della coltura di riferimento.

Risultati completi

Sono stati analizzati complessivamente 848 campioni per MRSA e SA mediante saggio Xpert MRSA/SA SSTI e coltura.

Tra gli 848 casi nel set di dati idoneo, per 207 soggetti è stato riportato l'uso di antibiotici nelle 3 settimane precedenti la raccolta del campione; per 441 soggetti non è stata confermato alcun uso di antibiotici; infine, in 200 casi, l'eventuale uso di antibiotici non era noto. Una diminuzione statisticamente rilevante del tasso di positività all'SA relativamente ai risultati della coltura, è stata osservata in concomitanza con l'uso di antibiotici (p=0,007); questo fenomeno è riportato anche nella letteratura.[10, 11, 12, 13, 14,] Anche il tasso di positività all'MRSA per la coltura risultava diminuito, seppur in misura minore (p=0,022). La diminuzione della positività non è stata osservata con il saggio Xpert MRSA/SA SSTI in caso di utilizzo di antibiotici, né è stata osservata alcuna inibizione nel saggio in presenza di antibiotici ad uso topico (vedere Sostanze Interferenti). La diminuzione dei tassi di positività della coltura per MRSA e SA in presenza di antibiotici, ha generato tassi falsi positivi più elevati di quanto previsto in relazione a quanto osservato con il saggio Xpert MRSA/SA SSTI.

Cinque (5) delle 246 colture positive per MRSA presentavo infezioni miste di MRSA e SA. Xpert MRSA/SA SSTI ha identificato 3 delle 5 infezioni miste come MRSA positive e 2 delle 5 come SA positive/MRSA negative.

Le prestazioni del saggio Xpert MRSA/SA SSTI sono riassunte nelle tabelle da 4 a 6.

Tabella 4. Prestazioni MRSA/SA in soggetti che non utilizzano antibiotici (nelle 3 settimane dalla raccolta del campione) rispetto alla Coltura di riferimento

		Coltura			
		MRSA+	**SA+/MRSA-**	**Neg/Crescita assente**	**Totale**
Xpert	MRSA+	137[a]	2	6	145
	SA+/MRSA-	3[b]	79	16	98
	SA-	6	4	188	198
	Totale	146	85	210	441

[a] 1 delle 137 era un'infezione mista da MSRA e SA.
[b] 2 delle 3 erano infezioni miste da MSRA e SA.

Concordanza percentuale positiva (MRSA+) = 93,8; Intervallo di confidenza 95% = 88,6 – 97,1

Concordanza percentuale negativa (MRSA+) = 97,3; Intervallo di confidenza 95% = 94,7 – 98,8

Concordanza percentuale positiva (SA+/MRSA+) = 95,7; Intervallo di confidenza 95% = 92,2 – 97,9

Concordanza percentuale negativa (SA+/MRSA+) = 89,5; Intervallo di confidenza 95% = 84,6 – 93,3

Tra i soggetti che non hanno utilizzato antibiotici nelle 3 settimane precedenti la raccolta del campione, il saggio Xpert MRSA/SA SSTI ha identificato il 93,8% dei campioni positivi per MRSA e il 97,3% dei campioni negativi per MRSA rispetto al metodo della coltura di riferimento, quindi il 95,7% dei campioni positivi per SA e l'89,5% dei campioni negativi per SA rispetto al metodo della coltura di riferimento.

Tra tali soggetti che non hanno fatto uso di antibiotici, per il 96,8% (427/441) il saggio Xpert MRSA/SA SSTI è riuscito al primo tentativo. I restanti 14 hanno generato risultati incerti al primo tentativo (6 "INVALID" – Non valido, 7 "ERROR" – Errore, e 1 "NO RESULT" – Nessun risultato) I 14 incerti al primo tentativo, hanno tutti fornito un risultato al secondo tentativo.

Tabella 5. Prestazioni MRSA/SA in soggetti con utilizzo sconosciuto di antibiotici (nelle 3 settimane dalla raccolta del campione) rispetto alla Coltura di riferimento

		Coltura			
		MRSA+	**SA+/MRSA-**	**Neg/Crescita assente**	**Totale**
Xpert	MRSA+	47[c]	0	4	51
	SA+/MRSA-	2	45	8	55
	SA-	1	2	91	94
	Totale	50	47	103	200

[c] 2 delle 47 erano infezioni miste da MSRA e SA.

Concordanza percentuale positiva (MRSA+) = 94,0; Intervallo di confidenza 95% = 83,5 – 98,7

Concordanza percentuale negativa (MRSA+) = 97,3; Intervallo di confidenza 95% = 93,3 – 99,3

Concordanza percentuale positiva (SA+/MRSA+) = 96,9; Intervallo di confidenza 95% = 91,2 – 99,4

Concordanza percentuale negativa (SA+/MRSA+) = 88,3; Intervallo di confidenza 95% = 80,5 – 93,8

Se l'utilizzo di antibiotici da parte dei soggetti nelle 3 settimane precedenti la raccolta del campione era sconosciuto, il saggio Xpert MRSA/SA SSTI ha identificato il 94,0% dei campioni positivi per MRSA e il 97,3% dei campioni negativi per MRSA rispetto al metodo della coltura di riferimento, quindi il 96,9% dei campioni positivi per SA e l'88,3% dei campioni negativi per SA rispetto al metodo della coltura di riferimento.

Tra tali soggetti con utilizzo di antibiotici sconosciuto, per il 97,0% (194/200) il saggio Xpert MRSA/SA SSTI è riuscito al primo tentativo. I restanti 6 hanno generato risultati incerti al primo tentativo (2 "INVALID" – Non valido, 3 "ERROR" – Errore, e 1 "NO RESULT" – Nessun risultato). I 6 incerti al primo tentativo, hanno tutti fornito un risultato al secondo tentativo.

Tabella 6. Prestazioni MRSA/SA in soggetti con utilizzo conosciuto di antibiotici (nelle 3 settimane dalla raccolta del campione) rispetto alla Coltura di riferimento

		Coltura			
		MRSA+	**SA+/MRSA-**	**Neg/Crescita assente**	**Totale**
Xpert	MRSA+	44	2	10	56
	SA+/MRSA-	3	31	19	53
	SA-	3	1	94	98
	Totale	50	34	123	207

Concordanza percentuale positiva (MRSA+) = 88,0; Intervallo di confidenza 95% = 75,7 – 95,5

Concordanza percentuale negativa (MRSA+) = 92,4; Intervallo di confidenza 95% = 87,0 – 96,0

Concordanza percentuale positiva (SA+/MRSA+) = 95,2; Intervallo di confidenza 95% = 88,3 – 98,7

Concordanza percentuale negativa (SA+/MRSA+) = 76,4; Intervallo di confidenza 95% = 67,9 – 83,6

Tra i soggetti con utilizzo di antibiotici conosciuto nelle 3 settimane precedenti la raccolta del campione, il saggio Xpert MRSA/SA SSTI ha identificato il'88,0% dei campioni positivi per MRSA e il 92,4% dei campioni negativi per MRSA rispetto al metodo della coltura di riferimento, quindi il 95,2% dei campioni positivi per SA e il '76,4% dei campioni negativi per SA rispetto al metodo della coltura di riferimento.

Tra tali soggetti con utilizzo di antibiotici, per il 96,1% (199/207) dei campioni idonei il saggio Xpert MRSA/SA SSTI è riuscito al primo tentativo. I restanti 8 hanno generato risultati incerti al primo tentativo (5 "INVALID" – Non valido e 3 "ERROR" – Errore). Gli 8 incerti al primo tentativo, hanno tutti fornito un risultato al secondo tentativo.

Varianti a cassetta vuota

Affinché un isolato venga identificato come positivo per MRSA con il saggio Xpert MRSA/SA SSTI, il test per la *spa* deve risultare positivo così come il test per il *mecA* e l'SCC*mec*. Un isolato positivo per la *spa* e l'SCC*mec*, ma non per il *mecA* viene riportato come SA poiché sensibile alla meticillina. Questa situazione può verificarsi quando la porzione dell'elemento SCC*mec* che porta il *mecA* viene recisa, ma le estremità di tale elemento mobile rimangono, producendo un segnale SSC*mec* positivo. A questi isolati, si fa a volte riferimento come "varianti a cassetta vuota" e sono non poco comuni nell'ambiente clinico. Il senso di questi isolati è quindi quello di confondere potenzialmente un saggio per MRSA che non rilevi direttamente il gene *mecA*. Il saggio Xpert MRSA/SA SSTI è progettato per la corretta di identificazione di tali varianti come SA.

Tra i campioni idonei inclusi nelle analisi dei dati presentate in questo rapporto, 16 isolati in totale corrispondono al profilo della cassetta vuota generando quindi risultati delle analisi positivi per *spa* e SCC*mec*, anche se non è stato rilevato alcun *mecA* (Ct=0), come illustrato in Tabella 7. Quindici (15) su 16 sono stati identificati come isolati veri negativi di MRSA rispetto alla coltura, e 14 su 16 sono stati invece identificati come isolati veri positivi di SA rispetto alla coltura. Un isolato è stato identificato come MRSA dalla coltura e 2 isolati risultavano negativi sia a MRSA che a SA secondo la coltura.

Tabella 7. Prestazioni MRSA/SA SSTI rispetto alla Coltura di riferimento - Varianti a cassetta vuota

Nr. soggetti	Xpert Risultato	*spa* (Ct)	*mecA* (Ct)	SCC*mec* (Ct)	Coltura	Xpert rispetto a Coltura	
						MRSA	SA
1	SA	23,6	0	26,0	SA	VN	VP
2	SA	14,7	0	16,5	SA	VN	VP
3	SA	20,5	0	34,0	SA	VN	VP
4	SA	18,4	0	21,0	SA	VN	VP
5	SA	15,6	0	28,4	MRSA	FN	VP
6	SA	17,2	0	31,6	SA	VN	VP
7	SA	34,1	0	35,6	Neg	VN	FP
8	SA	29,1	0	33,0	SA	VN	VP
9	SA	12,7	0	23,5	SA	VN	VP
10	SA	18,2	0	27,6	SA	VN	VP
11	SA	18,4	0	22,0	SA	VN	VP
12	SA	25,5	0	27,7	SA	VN	VP
13	SA	20,0	0	22,1	Neg	VN	FP
14	SA	26,0	0	28,3	SA	VN	VP
15	SA	23,9	0	25,7	SA	VN	VP
16	SA	19,9	0	34,0	SA	VN	VP

Prestazioni analitiche

Specificità analitica

Studio di reattività crociata

Centocinque (105) ceppi sono stati raccolti, quantificati e analizzati con il saggio Xpert MRSA/SA SSTI. Le 98 colture provenienti dall'American Type Culture Collection (ATCC) e i 7 ceppi provenienti dal Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* (NARSA) rappresentano le specie filogeneticamente correlate allo *Staphylococcus aureus* o quelle potenzialmente riscontrate in ambiente ospedaliero.

In queste, sono state incluse gli stafilococchi coagulasi negativi sensibili alla meticillina (29) e gli stafilococchi coagulasi negativi resistenti alla meticillina (9). Gli organismi analizzati sono stati identificati come Gram-positivi (74), Gram-negativi (28), o lieviti (3). Gli organismi sono stati inoltre identificati come aerobici (95) o anaerobici (10).

Sono state analizzate due (2) o più repliche di ogni isolato a 1,7-3,2 unità McFarland. Nelle condizioni dello studio, tutti gli isolati sono stati riportati negativi per MRSA e negativi per SA, nessuno degli isolati è stato rilevato dal saggio Xpert MRSA/SA SSTI. I controlli positivi e negativi sono stati inclusi nello studio. La specificità analitica era del 100%.

Valutazione dei ceppi BORSA

Sono stati analizzati sette (7) ceppi di *Staphylococcus aureus* con resistenza borderline all'oxacillina (BORSA), tra cui uno apparente "a cassetta vuota" (vedere quanto riportato sopra). Lo *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina è resistente a tutti i farmaci con beta-lattame grazie alla proteina PBP2 legante la penicillina codificata dal *mecA*[15]. I ceppi BORSA sono *mecA* negativi, ma inibiscono una concentrazione minima inibitoria (MIC) di oxacillina ≥ 2 e ≤ 8 µg/mL. E' molto importante distinguere tra l'MRSA e i ceppi BORSA per evitare un uso non necessario ed inappropriato di vancocimina e le precauzioni di isolamento non garantite per pazienti infetti da un ceppo sensibile al beta-lattame[16].

Nelle condizioni di questo studio, tutti i 7 isolati BORSA (incluso l'isolato apparente "a cassetta vuota") sono stati identificati come MRSA negativi/SA positivi a concentrazioni cellulari sia elevate che ridotte utilizzando il saggio Xpert MRSA/SA SSTI. Non è stato riportato alcun segnale *mecA*. Tali risultati dimostrano che un ceppo BORSA sarà identificato correttamente come MRSA negativo/SA positivo e non produrrà un risultato falso positivo all'analisi dell'MRSA utilizzando il saggio Xpert MRSA/SA SSTI.

Sensibilità analitica

Studi sul limite di rilevamento

Gli studi sono stati eseguiti per determinare intervalli di confidenza al 95% per il limite di rilevamento analitico (LoD) di cellule di *Staphylococcus aureus* (SA) e cellule di *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA) diluite in una matrice di ferita surrogata di origine umana. La matrice di ferita surrogata era composta da un concentrato di globuli bianchi ottenuto da centrifugazione di sangue intero. La matrice conteneva anche globuli rossi e plasma, e una quantità trascurabile di anticoagulante (CPD o CPDA-1). Il limite di rilevamento è definito come il numero più basso delle unità formanti colonie (CFU) per campione che possono essere riproducibilmente distinte da campioni negativi con intervallo di confidenza del 95% o con la concentrazione minima alla quale risultano positivi 19 su 20 repliche.

Per l'MRSA, repliche di 20 sono state valutate in ciascuna concentrazione di MRSA analizzata (CFU/tampone) per 6 singoli isolati rappresentanti i tipi SCC*mec* I, II, lll, lVa, V e Vl. Quando caratterizzati da elettroforesi in campo pulsato (PFGE), sono stati rappresentati l'USA 100, il ceppo più comune contratto in strutture sanitarie e l'USA400, uno dei ceppi più comuni contratto in comunità.

Per l'SA, le repliche di 20 sono state valutate su ciascuna concentrazione di SA (CFU/tampone) per 3 singoli isolati di SA. Sono stati rappresentati i tipi USA900 ed USA1200.

Gli intervalli di stima e confidenza sono stati determinati utilizzando la regressione logistica con dati (numero di risultati positivi per numero di repliche a ogni livello) su tutta la gamma di CFU/tamponi analizzati. Gli intervalli di confidenza sono stati determinati utilizzando le stime di probabilità sui parametri di modelli logistici con la matrice varianza-covarianza del campione grande. Le stime del punto LoD e gli intervalli di confidenza al 95% superiore e inferiore per ciascun SA e ciascun tipo SCC*mec* MRSA analizzato sono riassunte nelle tabelle 8 e 9.

Tabella 8. Intervalli di confidenza del 95% per LoD analitico - SA

ID ceppo SA	PFGE	LoD (CFU/tampone)	Minore IC al 95%	Maggiore IC al 95%
N7129	USA900	51	42	69
102-04	USA1200	87	76	109
29213	sconosciuto	123	97	188

Tabella 9. Intervalli di confidenza del 95% per LoD analitico - MRSA

ID ceppo MRSA	SCC*mec* Tipo	PFGE	LoD (CFU/tampone)	Minore IC al 95%	Maggiore IC al 95%
64/4176	I	USA500	221	195	271
N315	II	USA100	122	106	152
11373	III	sconosciuto	124	115	155
MW2	IVa	USA400	82	68	113
ST59-MRSA-V	V	USA1000	242	208	305
HDE288	VI	USA800	183	161	223

I risultati di questo studio indicano che il saggio Xpert MRSA/SA SSTI produrrà un risultato SA positivo nel 95% dei casi con confidenza al 95% per un tampone di ferita contenente 150 CFU, e un risultato MRSA positivo nel 95% dei casi con confidenza al 95% per un tampone di ferita contenente 300 CFU.

Centoventuno (121) ceppi aggiuntivi di *Staphylococcus aureus* sono stati analizzati con il saggio Xpert MRSA/SA SSTI. Le colture sono state incubate tutta la notte in un infuso cuore-cervello (BHI) e regolate a 0,5 unità McFarland. Tutti i ceppi sono stati analizzati in triplicato con 100 µL di colture diluite ulteriormente da 100 mila a un milione di volte.

I ceppi di MRSA (78) e di SA (43) sono stati selezionati per rappresentare ampiamente la gamma di diversità genetica riscontrata nella specie *Staphylococcus aureus* e basata sulla struttura filogenetica. Le selezioni rappresentano le stirpi primarie con enfasi sui complessi clonali specifici nei quali l'MRSA è stato osservato in misura maggiore. Sono state incluse le stirpi contenenti MRSA e SA, così come quelle contenenti solo SA.

Il saggio Xpert MRSA/SA SSTI ha identificato correttamente 116 ceppi su 121. I 5 ceppi discordanti erano caratterizzati da catalisi, coagulasi in provetta e colorazioni di Gram. La resistenza all'oxicillina mediata da *MecA* è stata valutata mediante disco-diffusione utilizzando un disco di cefoxitina di 30 µg e un cutoff di diametro di 21/22 mm.

Tre (3) dei 78 ceppi di MRSA sono risultati MRSA negativi/SA positivi con l'utilizzo del saggio MRSA/SA SSTI. L'ulteriore caratterizzazione indica che tali ceppi non sono resistenti e sono quindi stati correttamente identificati come MRSA negativi; SA positivi.

Due (2) dei 43 ceppi di SA sono risultati MRSA positivi/SA positivi con l'utilizzo del saggio MRSA/SA SSTI. L'ulteriore caratterizzazione indica che tali ceppi sono resistenti e sono quindi stati correttamente identificati come MRSA positivi/SA positivi.

Ognuno dei 12 isolati noti di USA300 è stato correttamente identificato come MRSA positivo e SA positivo, come da previsioni.

Valutazione delle varianti a cassetta vuota

Ventidue (22) isolati di *Staphylococcus aureus* identificati come "varianti a cassetta vuota" sono stati analizzati con il saggio Xpert MRSA/SA SSTI. Le colture incubate durante la notte sono state regolate a 0,5 unità McFarland. Tutti i ceppi sono stati analizzati da colture diluite ulteriormente 100 volte (alto) e 100mila volte (basso).

Il saggio Xpert MRSA/SA SSTI ha identificato correttamente tutti i 22 isolati come MRSA negativi e SA positivi. Con entrambe le concentrazioni cellulari sottoposte ad analisi, sono state riportati solo i valori Ct per i bersagli *spa* e SCC*mec*. Non è stato riportato alcun Ct *mecA*.

Studio di contaminazione da carry-over

È stato condotto uno studio per dimostrare che le cartucce GeneXpert monouso indipendenti impediscono la contaminazione da carry-over in campioni negativi eseguiti successivamente a campioni positivi molto elevati nello stesso modulo GeneXpert. Lo studio consisteva nell'elaborazione di un campione negativo nello stesso modulo GeneXpert subito dopo un campione positivo molto elevato di MSA (all'incirca 10^7CFU/analisi). L'operazione è stata ripetuta 20 volte tra 2 moduli GeneXpert per un totale di 42 esecuzioni. Non è risultata evidenza alcuna di eventuali contaminazioni da carry-over. Tutti i 21 campioni positivi sono stati correttamente identificati come MRSA positivi/SA positivi. Tutti i 21 campioni positivi sono stati correttamente identificati come MRSA negativi/SA negativi.

Riproducibilità

Un pannello di 10 campioni a concentrazioni variabili di SA, MRSA e *Staphylococcus epidermidis* (negativo) è stato analizzato in duplicato, in 10 giorni diversi, in ciascuno dei tre laboratori (10 campioni × 2 volte/giorno × 10 giorni × 3 laboratori). In ognuno dei 3 laboratori è stato utilizzato un lotto del kit Xpert MRSA/SA. I saggi Xpert MRSA/SA sono stati eseguiti secondo la procedura del saggio Xpert MRSA/SA SSTI.

Tabella 10. Riepilogo dei risultati di riproducibilità

ID del campione	Laboratorio 1	Laboratorio 2	Laboratorio 3	Concordanza totale
Neg (MSSE)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
SA Alto Neg	100% (20/20)	100% (20/20)	90% (18/20)	96,7% (58/60)
SA Basso Pos	100% (20/20)	100% (20/20)	95% (19/20)	98,3% (59/60)
MRSA1 Alto Neg	100% (20/20)	90% (18/20)	100% (20/20)	96,6% (58/60)
MRSA1 Basso Pos	100% (20/20)	100% (20/20)	90% (18/20)	96.6% (58/60)
MRSA2 Alto Neg	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
MRSA2 Basso Pos	100% (20/20)	95% (19/20)	95% (19/20)	96.6% (58/60)
% Concordanza totale per laboratorio	100% (140/140)	97.9% (137/140)	95.7% (134/140)	97.9% (411/420)

Tabella 11. Sintesi dei risultati del valore Ct per livello e controllo del campione

SPC			
Livello	**Media**	**Dev Std**	**% CV**
MRSA1 Alto Neg	34,52	0,82	2,36
MRSA2 Alto Neg	34,46	0,85	2,46
Neg (MSSE)	34,44	0,90	2,62
SA Alto Neg	34,38	0,92	2,66
Spa			
Livello	**Media**	**Dev Std**	**% CV**
MRSA1 Basso Pos	32,96	0,8	2,44
MRSA2 Basso Pos	31,05	0,69	2,21
SA Basso Pos	33,91	0,8	2,35
mecA			
Livello	**Media**	**Dev Std**	**% CV**
MRSA1 Basso Pos	33,25	0,80	2,40
MRSA2 Basso Pos	31,50	0,68	2,16
SCC*mec*			
Livello	**Media**	**Dev Std**	**% CV**
MRSA1 Basso Pos	34,19	0,90	2,63
MRSA2 Basso Pos	33,13	0,68	2,05

Un secondo studio di riproducibilità è stato eseguito utilizzando un panello di 4 campioni di (SA: 10X LoD, MRSA1: 10X LoD, MRSA2: 10X LoD, e Controllo Negativo: *Staphylococcus epidermidis*). I pannelli sono stati analizzati in duplicato in 10 giorni diversi in ciascuno dei tre laboratori (4 campioni x 2 volte/giorno x 10 giorni x 3 laboratori). In ognuno dei 3 laboratori è stato utilizzato un lotto del saggio Xpert MRSA/SA SSTI. I saggi Xpert MRSA/SA SSTI sono stati eseguiti secondo la procedura del saggio Xpert MRSA/SA SSTI. Risultati corretti sono stati ottenuti in 239 su 240 analisi.

Tabella 12. Riepilogo dei risultati di riproducibilità

ID del campione	Laboratorio 1	Laboratorio 2	Laboratorio 3	Concordanza totale
Neg (MSSE)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Pos Moderato SA[1]	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Pos Moderato MRSA1[1]	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Pos Moderato MRSA2[1]	100% (20/20)	100% (20/20)	95% (19/20)	98,3% (59/60)
% Concordanza totale per laboratorio	100% (80/80)	100% (80/80)	98,8% (79/80)	99,6% (239/240)

[1] 10X LoD

Tabella 13. Sintesi dei risultati del valore Ct per livello e controllo del campione

SPC			
Livello	**Media**	**Dev Std**	**% CV**
Pos Moderato MRSA1	35,72	1,87	5,24
Pos Moderato MRSA2	36,29	2,66	7,34
Pos Moderato SA	34,55	1,19	3,44
NEG	34,45	1,06	3,09
Spa			
Livello	**Media**	**Dev Std**	**% CV**
Pos Moderato MRSA1	29,52	1,30	4,40
Pos Moderato MRSA2	28,91	1,03	3,57
Pos Moderato SA	30,59	0,91	2,99
mecA			
Livello	**Media**	**Dev Std**	**% CV**
Pos Moderato MRSA1	29,78	1,28	4,29
Pos Moderato MRSA2	29,32	1,24	4,22
SCC*mec*			
Livello	**Media**	**Dev Std**	**% CV**
Pos Moderato MRSA1	31,49	1,26	3,99
Pos Moderato MRSA2	31,05	1,12	3,59

Riferimenti bibliografici

1. Bannerman TL. 2003 Capitolo 28: Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci that Grow Aerobically. Manual of clinical microbiology, 8th ed. ASM Press Washington, DC. Pagine 384-404.
2. Mainous AG, Hueston WJ, Everett, et al. 2006. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *S aureus* in the United States, 2001-2002. An Family Medicine. 4(2):132-137.
3. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. Am J Infect Control 2004;32:470-85.
4. Chaix C, Durand-Zileski I, Alberti C, Buisson B. 1999. Control of Endemic Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. JAMA 282(19):1745-51.
5. Shopsin B, Kreiswirth BN. 2001. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Emerging Infectious Diseases 7(2) 323-6.
6. Salgado CD et al. 2003. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Meta-analysis of Prevalence and Risk Factors. CID 36:131.
7. Donnio, P-Y, Février F, Bifani P, et al. 2007. Molecular and epidemiological evidence for the spread of multiresistant methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains in hospitals. Antimicrobial. Agents Chemother. 51: 4342 – 4350.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). HHS Publication number (CDC) 93-8395.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (già National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (refer to latest edition).
10. Ewig S, Schlochtermeier M, Göke N, et al. 2002. Applying sputum as a diagnostic tool in pneumonia: limited yield, minimal impact on treatment decisions. Chest. 121:1486-1492.
11. RG Dotson and SK Pingleton. 1993. The effect of antibiotic therapy on recovery of intracellular bacteria from bronchoalveolar lavage in suspected ventilator-associated nosocomial pneumonia. Chest. 103, 541-546.
12. Souweine B, Veber B, Bedos JP, et al. 1998. Diagnostic accuracy of protected specimen brush and bronchoalveolar lavage in nosocomial pneumonia: impact of previous antimicrobial treatments. Crit Care Med. Feb;26(2):236-244.
13. Kanegaye JT, Soliemanzadeh P, Bradley JS, et al. 2001. Lumbar puncture in pediatric bacterial meningitis: defining the time interval for recovery of cerebrospinal fluid pathogens after parenteral antibiotic pretreatment. Pediatrics. 108(5):1169-1174.
14. Brook I, Gober A. 2005. Effects of amoxicillin and cefdinir on nasopharyngeal bacterial flora. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. Sep;131:785-787.
15. Nadarajah J, et. al., Identification of different clonal complexes and diverse amino acid substitutions in penicillin-binding protein 2 (PBP2) associated with borderline oxacillin resistance in Canadian *Staphylococcus aureus* isolates. J of Med Micro (2006), 55: 1675-1683.
16. Ribeiro J, et. al., Misclassification of Susceptible Strains of *Staphylococcus aureus* as Methicillin-Resistant *S. aureus* by a rapid Automated Susceptibility Testing System. (1999), 37: 1619-1620.

Assistenza

Per ricevere assistenza, contattare Cepheid a uno dei seguenti recapiti. Quando si contatta l'Assistenza tramite telefono o posta elettronica, accertarsi di fornire il numero di serie dello strumento e l'ID del lotto reagenti.

Unione Europea

Per l'assistenza tecnica, utilizzare i seguenti recapiti:

Tel: +33.563.82.53.19

E-mail: techsupport@cepheideurope.fr

Altri Paesi

Contattare il rappresentante Cepheid locale.

Tabella dei simboli

Simbolo	Significato
REF	Numero di catalogo
IVD	Dispositivo medico per diagnostica *in vitro*
	Non riutilizzare
LOT	Codice lotto
	Attenzione: consultare la documentazione allegata
	Produttore
	Contiene quantità sufficiente per <n> analisi
	Data di scadenza
CONTROL	Controllo
EC REP	Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea
CE	Marchio CE – Comunità Europea
	Limitazione della temperatura
	Rischi biologici

Cepheid AB
Röntgenvägen 5
SE-171 54 Solna
Svezia

Prodotto in Svezia

EC REP

Cepheid Europe
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
Francia

Tel: +33.563.82.53.00
Fax: +33.563.82.53.01
E-mail: cepheid@cepheideurope.fr

CE IVD

Português

Apenas para utilização em diagnóstico *in vitro*

Nome patenteado

Xpert® MRSA/SA SSTI

Nome comum ou usual

Ensaio MRSA/SA SSTI

Utilização prevista

O ensaio de infecção da pele e tecidos moles Xpert MRSA/SA da Cepheid (Ensaio Xpert MRSA/SA SSTI), efectuado no sistema GeneXpert® Dx, é um teste de diagnóstico *in vitro* qualitativo, concebido para a detecção rápida de *Staphylococcus aureus* (SA) e de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), a partir de zaragatoas de infecção da pele e tecidos moles. O teste utiliza a reacção em cadeia da polimerase automatizada em tempo real (PCR), para detectar o ADN de MRSA/SA. O ensaio Xpert MRSA/SA SSTI está indicado para utilização em conjunto com outros testes laboratoriais, tais como cultura microbiológica e dados clínicos à disposição do médico, como um método auxiliar para a detecção de MRSA/SA em infecções da pele e tecidos moles. O ensaio Xpert MRSA/SA SSTI não se destina a monitorizar o tratamento de infecções por MRSA/SA. As culturas concomitantes de SA e MRSA são necessárias para recolher organismos para testes de susceptibilidade ou tipagem epidemiológica.

Resumo e explicação

O *Staphylococcus aureus* (SA) é um patogénio oportunista humano, bem documentado, e um importante patogénio nosocomial, que causa um espectro de doenças. Algumas das doenças envolvem infecções da pele e tecidos moles, incluindo carbúnculos e furúnculos, bem como infecções de feridas pós-operatórias em várias zonas do corpo. Enquanto patogénio nosocomial, o *S. aureus* tem sido uma das principais causas de morbilidade e mortalidade. As infecções causadas por *S. aureus* são, muitas vezes, agudas e piogénicas e, se não forem tratadas, podem propagar-se aos tecidos envolventes, ou através de bacteriemia aos locais metastáticos (envolvendo outros órgãos). Algumas das infecções mais graves causadas pelo *S. aureus* são a bacteriemia, pneumonia, osteomielite, endocardite aguda, síndrome de choque tóxico, intoxicação alimentar, miocardite, pericardite, cerebrite, meningite, corioamnionite, síndrome da pele queimada e abcessos dos músculos, tracto urogenital, sistema nervoso central e de vários órgãos intra-abdominais[1].

No início da década de 1950, a aquisição e disseminação de plasmídeos produtores de beta-lactamase diminuíram a eficácia da penicilina no tratamento de infecções por *S. aureus*. Em 1959, foi introduzida a meticilina, uma penicilina sintética. Contudo, em 1960, foram identificadas estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina. Determinou-se que esta situação resultava da aquisição pelo *S. aureus* do gene *mecA*. Actualmente nos EUA, o MRSA é responsável por cerca de 25 % das infecções nosocomiais, tendo vindo a aumentar o número de participações de casos de MRSA adquiridos na comunidade, resultando em morbilidade e mortalidade significativas. Foram registadas 33 % e 16 % de mortalidades atribuíveis às bacteriemias causadas por MRSA e *S. aureus* (SA) sensível à meticilina, respectivamente. Também existem preocupações relativamente ao aumento dos custos associados às infecções por MRSA. Numa tentativa de limitar a propagação destas infecções, estão a ser desenvolvidas e implementadas estratégias e políticas de controlo nas unidades de cuidados de saúde. O controlo do MRSA é um objectivo principal da maioria dos programas de controlo de infecções hospitalares. Actualmente, o método padrão para detectar MRSA e SA consiste na cultura, a qual é bastante laboriosa e pode necessitar de vários dias para gerar um resultado definitivo.[2,3,4,5,6,7]

Princípio do procedimento

O sistema GeneXpert Dx automatiza e integra a purificação das amostras, a amplificação dos ácidos nucleicos e a detecção das sequências-alvo em amostras simples ou complexas, utilizando ensaios de PCR em tempo real. O sistema é composto por um instrumento, um computador e software pré-instalado para efectuar testes e visualizar os resultados. O sistema requer a utilização de cartuchos descartáveis de utilização única que contêm os reagentes de PCR e onde decorre o processo de PCR. Como os cartuchos são autónomos, a contaminação cruzada entre amostras é minimizada. Para uma descrição completa do sistema, consulte o *Manual do utilizador do sistema GeneXpert Dx*.

O ensaio Xpert MRSA/SA SSTI inclui reagentes para a detecção de MRSA e SA, assim como um controlo de processamento da amostra (SPC, do inglês sample processing control) para controlar o processamento adequado das bactérias-alvo e para monitorizar a presença de inibidor(es) da reacção de PCR. O SPC também assegura que as condições da reacção de PCR (temperatura e tempo) são adequadas para a reacção de amplificação e que os reagentes da PCR estão funcionais. O controlo de verificação da sonda (PCC, do inglês Probe Check Control) verifica a reidratação dos reagentes, o enchimento do tubo de PCR no cartucho, a integridade da sonda e a estabilidade do corante.

Os primers e as sondas presentes no ensaio Xpert MRSA/SA SSTI detectam sequências patenteadas da proteína estafilocócica A (*spa*), o gene da resistência à meticilina (*mecA*) e a cassete no cromossoma estafilocócico (SCC*mec*), inserida no local cromossomático *attB* do SA.

Reagentes e instrumentos

Material fornecido

O kit do ensaio Xpert MRSA/SA SSTI contém reagentes suficientes para processar 10 amostras biológicas ou amostras de controlo da qualidade. O kit contém os seguintes itens:

Cartuchos do ensaio Xpert MRSA/SA SSTI com tubos de reacção integrados	**10**
Esferas 1 , 2 e 3 (liofilizadas)	**1 por cartucho**
Reagente 1 do ensaio Xpert MRSA/SA SSTI	**2,8 ml por cartucho**
Reagente 2 do ensaio Xpert MRSA/SA SSTI	**3,2 ml por cartucho**
Reagente de eluição do ensaio Xpert MRSA/SA SSTI	**10**
Reagente de eluição (tiocianato de guanidina)	**1 x 2,0 ml por bolsa**
CD	**1 por kit**
Ficheiro de definição de ensaio (ADF)	
Instruções para importar ADF em sistema GX	
Instruções	

Notas:

- As Fichas de Dados de Segurança (SDS) estão disponíveis em www.cepheid.com/tests-and-reagents/literature/msds ou www.cepheidinternational.com/tests-and-reagents/literature/msds.
- A albumina sérica bovina (BSA — bovine serum albumin) presente nas esferas foi produzida exclusivamente a partir de plasma bovino proveniente dos EUA. O fabrico da BSA também decorreu nos EUA. Nenhuma proteína de ruminante ou outra proteína animal foi administrada aos animais; os animais foram aprovados em testes ante e post-mortem. Durante o processamento, não houve mistura do material com outros materiais de origem animal.

Conservação e manuseamento

- Conserve os cartuchos e reagentes do ensaio Xpert MRSA/SA SSTI a 2 – 28 °C.
- Não utilize reagentes ou cartuchos fora do prazo da validade.
- Não abra um cartucho até estar pronto para realizar o teste.
- Utilize o cartucho e os reagentes dentro de 30 minutos após a abertura da tampa do cartucho.
- Não utilize quaisquer reagentes que tenham ficado turvos ou descoloridos.

Materiais necessários não fornecidos

- Sistema GeneXpert Dx (a referência varia com a configuração): instrumento GeneXpert, computador, leitor de códigos de barras e Manual do utilizador
- Impressora (consulte o *Manual do utilizador do sistema GeneXpert Dx* para obter as orientações de compatibilidade)
- Dispositivo de colheita de amostras Cepheid (900-0370) ou Copan equivalente
- Agitador vortex
- Pipetas de transferência descartáveis
- Gaze esterilizada

Materiais necessários não fornecidos

KWIK-STIKs™ MicroBiologics ref. 0158MRSA e ref. 0360SA como controlos positivos e ref. 0371MSSE (*Staphylococcus epidermis* sensíveis à meticilina) como controlo negativo.

Advertências e precauções

- Trate todas as amostras biológicas, incluindo os cartuchos usados, como sendo capazes de transmitir agentes infecciosos. Dado que é frequentemente impossível saber quais as amostras biológicas que poderão ser infecciosas, todas deverão ser tratadas aplicando as precauções padrão. As directivas para o manuseamento de amostras estão disponíveis nos Centros de Controlo e Prevenção de Doenças[8], e no Clinical and Laboratory Standards Institute (anteriormente, National Committee for Clinical Laboratory Standards) dos EUA.[9]

  Numa cultura mista contendo MRSA/SA e outros organismos (por exemplo, bacilos Gram-negativo, levedura), os resultados poderão ser falsos negativos ou variáveis, dependendo da concentração de MRSA/SA presente, em particular se a concentração de MRSA/SA for próxima do limite de detecção (LoD) do ensaio.

- Siga os procedimentos de segurança da sua instituição para trabalhar com produtos químicos e manusear amostras biológicas.
- O ensaio Xpert MRSA/SA SSTI pode detectar ADN de MRSA e/ou SA a partir de organismos não viáveis. A probabilidade de isto ocorrer aumenta em pacientes que estejam a tomar antibióticos.
- O ensaio Xpert MRSA/SA SSTI não fornece resultados de testes de susceptibilidade antimicrobiana. É necessário tempo adicional para as culturas e para efectuar testes de susceptibilidade.
- Não substitua o reagente de ensaio Xpert MRSA/SA SSTI por outros reagentes
- Não abra a tampa do cartucho do ensaio Xpert MRSA/SA SSTI, excepto ao adicionar a amostra e o reagente ou ao repetir um teste.
- Não utilize um cartucho que tenha caído ou sido agitado depois de ter adicionado a amostra e o reagente.
- Não utilize um cartucho que tenha um tubo de reacção danificado.
- Cada cartucho de utilização única do ensaio Xpert MRSA/SA SSTI é utilizado para processar um teste. Não reutilize cartuchos usados.
- Consulte o pessoal responsável pelos resíduos ambientais da instituição para obter informações sobre a eliminação adequada dos cartuchos usados e dos reagentes não utilizados. Este material pode apresentar características de resíduos perigosos de acordo com a lei federal "Resource Conservation and Recovery Act" (RCRA - Lei da Recuperação e Conservação dos Recursos) da Associação de Protecção Ambiental (Environmental Protection Agency) dos EUA e deve cumprir os requisitos específicos sobre eliminação. Consulte os regulamentos locais e estatais, podem diferir dos regulamentos de eliminação federais. As instituições fora dos EUA, devem consultar os requisitos sobre a eliminação ambiental de resíduos perigosos do país.
- Conserve o kit do ensaio Xpert MRSA/SA SSTI a 2 – 28 °C.
- Não abra a tampa do cartucho até estar pronto para realizar o teste.
- O reagente de eluição contém tiocianato de guanidina (H402, EUH301), que é nocivo para os organismos aquáticos e o contacto com ácido liberta gases tóxicos.
- O reagente 2 contém hidróxido de sódio; (H314), que é corrosivo para os olhos e a pele, exigindo a utilização de protecção dos olhos e da pele.

Colheita, transporte e conservação de amostras

As zaragatoas das amostras de infecções da pele e tecidos moles podem ser recolhidas com o dispositivo de colheita de amostras Cepheid, seguindo os procedimentos padrão da instituição do utilizador. As zaragatoas das amostras são recolocadas no tubo de transporte de plástico (recomenda-se um meio Stuarts líquido, dispositivo de colheita de amostras Cepheid ou Copan equivalente), conservadas à temperatura ambiente e enviadas para a área de teste GeneXpert, para serem processadas no dia seguinte. As restantes zaragatoas não testadas, destinadas à cultura microbiológica, devem ser colocadas em sistemas de transporte adequados e semeadas nos 4 dias seguintes. Se não tiver sido enviada até ao dia seguinte, a amostra deverá ser transportada em gelo. Em alternativa, as zaragatoas poderão ser conservadas para teste a 2 – 8 °C, até 5 dias.

Cultura microbiológica

Relativamente aos métodos de cultivo de infecções da pele e tecidos moles (SSTI, do inglês Skin and soft tissue infections), siga os procedimentos operativos normalizados em vigor no laboratório. Para efectuar as culturas, as zaragatoas restantes não testadas devem ser colocadas em sistemas de transporte adequados e semeadas nos 4 dias seguintes.

Procedimento

Preparação do cartucho

Importante: Inicie o teste nos 15 minutos seguintes à adição dos reagentes ao cartucho.

Para adicionar a amostra e o reagente ao cartucho:

1. Retire o cartucho e o reagente da embalagem.
2. Retire a zaragatoa do recipiente de transporte.

Nota: Utilize gaze esterilizada para manipular a zaragatoa, de forma a minimizar o risco de contaminação.

3. Insira a zaragatoa no tubo que contém o reagente de eluição e quebre a zaragatoa.
4. Feche a tampa do frasco de eluição e agite o mesmo em vortex a alta velocidade, durante 10 segundos.
5. Abra a tampa do cartucho. Utilizando uma pipeta de transferência esterilizada, transfira todo o conteúdo do reagente de eluição para a câmara "S" do cartucho do ensaio Xpert MRSA/SA SSTI.
6. Feche a tampa do cartucho.

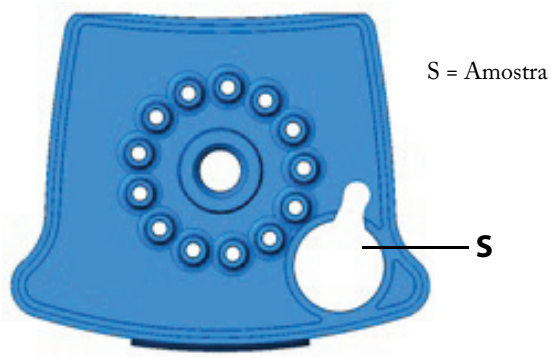

Figura 1. Cartucho do ensaio Xpert MRSA/SA SSTI (vista de cima)

Início do teste

Importante: Antes de iniciar o teste, certifique-se de que as definições do ensaio Xpert MRSA/SA SSTI são importadas para o software.

Esta secção lista os passos básicos para realizar o teste. Para obter instruções detalhadas, consulte o *Manual do utilizador do sistema GeneXpert Dx*.

1. Ligue o instrumento GeneXpert Dx e depois ligue o computador. O software GeneXpert arranca automaticamente.
2. Inicie sessão no software do sistema GeneXpert Dx utilizando o nome de utilizador e a palavra-passe.
3. Na janela do **sistema GeneXpert Dx**, clique em **Create Test** (**Criar teste**). Surge a caixa de diálogo **Scan Cartridge Barcode** (**Ler código de barras do cartucho**).
4. Leia o código de barras do cartucho do ensaio Xpert MRSA/SA SSTI. Surge a janela **Create Test** (**Criar teste**). Utilizando as informações do código de barras, o software vai preencher automaticamente as caixas dos campos seguintes: Select Assay (Seleccionar ensaio), Reagent Lot ID (ID do lote de reagente), Cartridge SN (N.º série do cartucho) e Expiration Date (Prazo de validade).
5. Na caixa **Sample ID** (**ID da amostra**), leia ou introduza a ID da amostra. Certifique-se de que introduz a ID da amostra correcta. A ID da amostra está associada aos resultados do teste e é apresentada na janela **View Results** (**Ver resultados**) e em todos os relatórios.
6. Clique em **Start Test** (**Iniciar teste**). Na caixa de diálogo apresentada, introduza a sua palavra-passe.
7. Abra a porta do módulo do instrumento com a luz verde a piscar e coloque o cartucho.
8. Feche a porta. O teste inicia-se e a luz verde pára de piscar. Quando o teste termina, a luz desliga-se.
9. Antes de abrir a porta do módulo e retirar o cartucho, aguarde até o sistema desbloquear a porta.
10. Os cartuchos usados devem ser eliminados nos contentores adequados para resíduos biológicos, de acordo com as práticas padrão da sua instituição.

Visualização e impressão dos resultados

Para obter instruções detalhadas sobre como visualizar e imprimir os resultados, consulte o *Manual do utilizador do sistema GeneXpert Dx*.

CONTROL

Controlo de qualidade

Controlos de qualidade integrados

Cada teste inclui um controlo de processamento da amostra (SPC ou BG3 no ecrã de visualização de resultados, para o utilizador de nível administrativo) e um controlo de verificação da sonda (PCC).

- **Controlo de processamento da amostra (SPC)** — assegura que a amostra foi correctamente processada. O SPC contém esporos de *Bacillus globigii*, sob a forma de um bolo de esporos secos que é incluído em cada cartucho para verificar o processamento adequado da amostra do ensaio Xpert MRSA/SA SSTI. O SPC verifica se ocorreu a lise do *Staphylococcus aureus* se os organismos estiverem presentes e verifica se o processamento da amostra é adequado. Além disso, este controlo detecta a inibição associada à amostra do ensaio de PCR em tempo real, assegura que as condições da reacção de PCR (temperatura e tempo) são adequadas para a reacção de amplificação e que os reagentes da PCR estão funcionais. O SPC deve ser positivo numa amostra negativa e pode ser negativo ou positivo numa amostra positiva. O SPC é aprovado se preencher os critérios de aceitação validados.
- **Controlo de verificação da sonda (PCC)** — Antes do início da reacção de PCR, o sistema GeneXpert Dx mede o sinal de fluorescência das sondas para monitorizar a reidratação das esferas, o enchimento do tubo de reacção, a integridade da sonda e a estabilidade do corante. O PCC é aprovado se preencher os critérios de aceitação atribuídos.

Controlos externos

- KWIK-STIKs™ (MicroBioLogics, ref. 0158MRSA [SCC*mec* tipo II] e ref. 0360SA como controlos positivos e ref. 0371MSSE como controlo negativo) podem ser utilizados para formação, testes de proficiência e controlo de qualidade externo do GeneXpert Dx System. Estirpes de MRSA que representem outros tipos de SCC*mec*, se estiverem disponíveis, podem ser utilizadas como controlos positivos externos adicionais, para monitorizar os primers e sondas não directamente controlados no ensaio. Os controlos externos podem ser utilizados de acordo com os regulamentos dos organismos de acreditação e governamentais, conforme aplicável. Siga o procedimento do controlo externo da MicroBioLogics descrito a seguir:
  1. Abra a bolsa no entalhe e retire o KWIK-STIK.
  2. Aperte o fundo da ampola na tampa para libertar o líquido hidratante.
  3. Segure na vertical e bata levemente para facilitar a passagem do líquido pela haste até ao fundo da unidade que contém o *pellet*.
  4. Para facilitar a dissolução do *pellet* de células liofilizadas, esmague-o e aperte suavemente a câmara inferior.
  5. Rasgue o KWIK-STIK para libertar a zaragatoa e insira-a no tubo que contém o reagente de eluição (tampa de enroscar).
  6. A zaragatoa KWIK-STIK está agora pronta para o teste do ensaio Xpert MRSA/SA SSTI.
  7. Se o controlo de qualidade externo não funcionar como esperado, repita o teste de controlo externo e/ou contacte a Cepheid para obter assistência.

As figuras 2 a 5 apresentam exemplos de resultados de ensaio Xpert MRSA/SA SSTI.

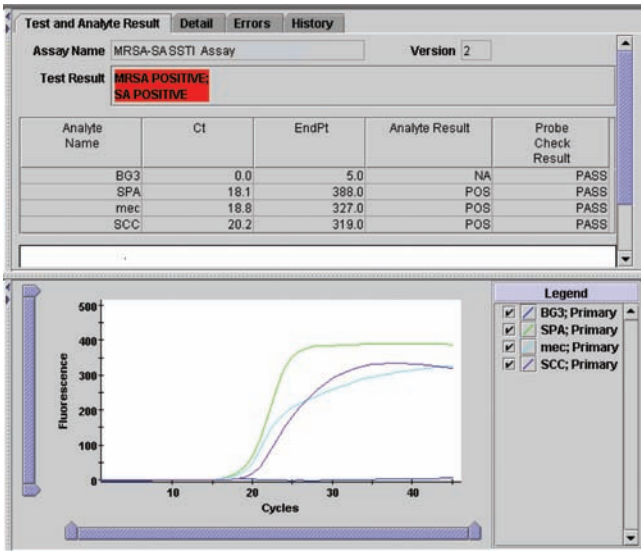

Figura 2. Exemplo de um resultado MRSA positivo/SA positivo

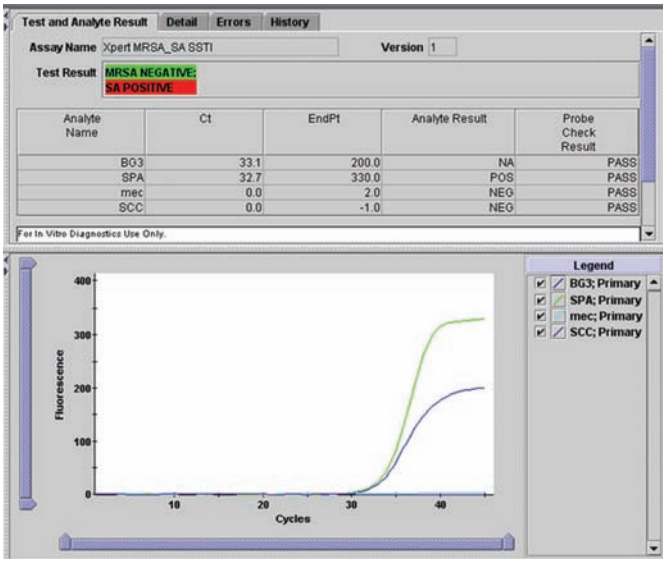

Figura 3. Exemplo de um resultado MRSA negativo/SA positivo

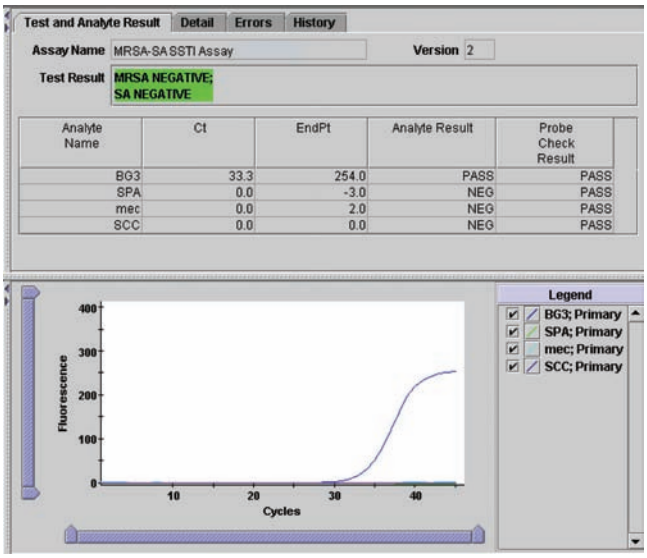

Figura 4. Exemplo de um resultado MRSA negativo/SA negativo

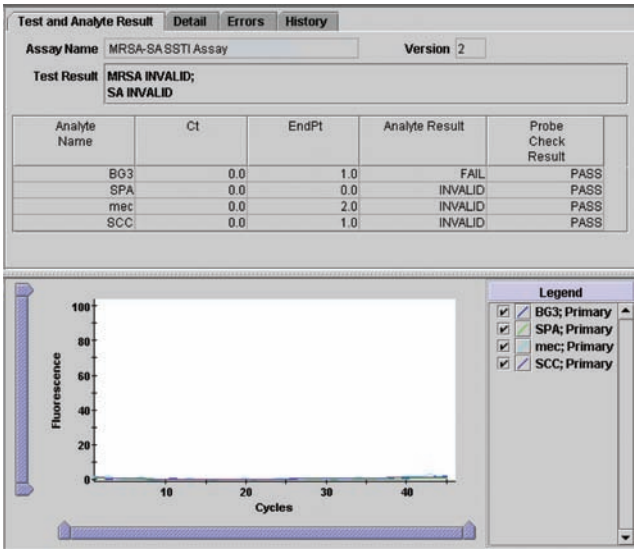

Figura 5. Exemplo de um resultados inválido

Interpretação dos resultados

Os resultados são interpolados pelo sistema GeneXpert Dx a partir dos sinais de fluorescência medidos e dos algoritmos de cálculo incorporados, sendo apresentados na janela **View Results** (**Ver resultados**). Os resultados possíveis são:

MRSA POSITIVE/SA POSITIVE (MRSA POSITIVO/SA POSITIVO)
O ensaio Xpert MRSA/SA SSTI pode detectar ADN de MRSA e/ou SA a partir de organismos não viáveis.

Detectadas sequências-alvo de ADN de MRSA/detectada sequência-alvo de ADN de SA.

- MRSA POSITIVE (MRSA POSITIVO) — todos os alvos MRSA (*spa*, *mecA* e SCC*mec*) têm um limite de ciclo (Ct) dentro do intervalo válido e um endpoint acima do valor mínimo.
- SPC — NA (não aplicável); o SPC é ignorado na medida em que a amplificação de MRSA pode competir com este controlo.
- Probe Check—PASS (Verificação da sonda: APROVADA); todos os resultados de verificação da sonda são aprovados.

MRSA NEGATIVE/SA POSITIVE (MRSA NEGATIVO/SA POSITIVO)
O ensaio Xpert MRSA/SA SSTI pode detectar ADN de MRSA e/ou SA a partir de organismos não viáveis.

- Não foram detectadas sequências-alvo de ADN de MRSA/detectada sequência-alvo de ADN de SA.
- SA POSITIVE (SA POSITIVO) — o SA-alvo (*spa*) tem um Ct dentro do intervalo válido e um endpoint acima do valor mínimo. Não foi detectado ADN-alvo de SCC*mec*, o ADN-alvo de *mecA* pode ter sido detectado ou não, ou foi detectado ADN-alvo de SCC*mec* e não foi detectado ADN-alvo de *mecA* ("cassete vazia").
- SPC — NA (não aplicável); o SPC é ignorado na medida em que a amplificação de SA pode competir com este controlo.
- Probe Check — PASS (Verificação da sonda: APROVADA); todos os resultados de verificação da sonda são aprovados.

Um resultado positivo não indica necessariamente a presença de organismos viáveis. Indica, no entanto, a presença presumível de MRSA ou SA.

MRSA NEGATIVE/SA NEGATIVE (MRSA NEGATIVO/SA NEGATIVO)
Não foi detectada sequência-alvo de ADN de *Staphylococcus aureus*. O SPC cumpre os critérios de aceitação.

- NEGATIVE (NEGATIVO) — não foi detectada sequência-alvo de ADN de *Staphylococcus aureus* (*spa*). Pode ter sido detectado ou não ADN-alvo de *mecA*, ou pode ter sido detectado ou não ADN-alvo de SCC*mec*.
- SPC — PASS (SPC: APROVADO); o SPC tem um Ct dentro do intervalo válido e um endpoint acima do valor mínimo.
- Probe Check — PASS (Verificação da sonda: APROVADA); todos os resultados de verificação da sonda são aprovados.

Poderá obter-se um resultado falso negativo para MRSA (um resultado de "MRSA NEGATIVE; SA POSITIVE" ("MRSA NEGATIVO; SA POSITIVO") em vez de "MRSA POSITIVE; SA POSITIVE" ("MRSA POSITIVO; SA POSITIVO")) se tanto o MRSA como o SA estiverem presentes na amostra, num rácio MRSA:SA de $1{:}1x10^6$ ou superior.

Nos estudos clínicos, 5 das 246 culturas positivas de MRSA apresentavam infecções mistas de MRSA e SA. O Xpert MRSA/SA SSTI identificou 3 das 5 infecções mistas como MRSA positivo e 2 das 5 infecções como SA positivo/MRSA negativo.

INVALID (INVÁLIDO)
Não é possível determinar a presença ou ausência de sequências-alvo de ADN de MRSA/SA, repita o teste de acordo com as instruções da secção seguinte. O SPC não preenche os critérios de aceitação, a amostra não foi processada adequadamente ou o PCR foi inibido.

- INVALID (INVÁLIDO) — Não pode ser determinada a presença ou ausência de ADN de *Staphylococcus aureus*.
- SPC-FAIL (SPC: NÃO APROVADO) — o resultado do alvo do SPC é negativo, o limite de ciclo (Ct) do SPC não está dentro do intervalo válido e o endpoint está abaixo do valor mínimo.
- Probe Check — PASS (Verificação da sonda: APROVADA); todos os resultados de verificação da sonda são aprovados.

ERROR (ERRO)
Não é possível determinar a presença ou ausência de sequências-alvo de ADN de MRSA/SA, repita o teste de acordo com as instruções da secção seguinte. O controlo de verificação da sonda falhou, provavelmente devido ao enchimento inadequado do tubo de reacção, à detecção de um problema de integridade da sonda ou porque os limites máximos da pressão foram excedidos.

- MRSA — NO RESULT (MRSA — SEM RESULTADO)
- SA — NO RESULT (SA — SEM RESULTADO)
- SPC — NO RESULT (SPC — SEM RESULTADO)
- Probe Check — FAIL (Verificação da sonda - NÃO APROVADA)*; um ou mais resultados da verificação da sonda falharam.

*Se a verificação da sonda for aprovada, o erro é causado por uma falha de um componente do sistema.

NO RESULT (SEM RESULTADO)
Não é possível determinar a presença ou ausência de sequências-alvo de ADN de MRSA/SA, repita o teste de acordo com as instruções da secção seguinte. Não foram recolhidos dados suficientes para produzir um resultado de teste. Por exemplo, isto pode ocorrer se o operador interrompeu um teste que estava a decorrer.

- MRSA — NO RESULT (MRSA — SEM RESULTADO)
- SA — NO RESULT (SA — SEM RESULTADO)
- SPC — NO RESULT (SPC — SEM RESULTADO)
- Probe Check — NA (Verificação da sonda - não aplicável)

Motivos para repetir um ensaio

Repita o teste utilizando um novo cartucho (não reutilize o cartucho) e reagentes novos. Efectue o procedimento de repetição de teste no prazo de 3 horas após a obtenção de um resultado indeterminado.

Um resultado INVÁLIDO indica que o controlo SPC falhou. A amostra não foi processada correctamente ou o PCR foi inibido.

Um resultado com ERRO indica que o controlo de verificação da sonda falhou e que o ensaio foi cancelado, possivelmente devido ao enchimento inadequado do tubo de reacção, à detecção de um problema de integridade da sonda de reagente ou porque os limites máximos da pressão foram excedidos.

SEM RESULTADO indica que os dados recolhidos foram insuficientes. Por exemplo, o operador parou um teste que estava a decorrer.

Se um controlo de qualidade externo não funcionar como esperado, repita o teste de controlo externo e/ou contacte a Cepheid para obter assistência.

Para efectuar a repetição do teste:

Se efectuar a repetição do teste no prazo de 3 horas após a obtenção de um resultado indeterminado*:

1. Transfira o conteúdo restante da câmara S para um novo reagente de eluição, utilizando uma pipeta de transferência descartável.
2. Agite em vortex e adicione todo o conteúdo do reagente de eluição à câmara S do novo cartucho do ensaio MRSA/SA SSTI.
3. Feche a tampa e inicie o novo teste.

* Se a repetição do teste não puder ser efectuada num prazo de 3 horas, utilize uma nova amostra.

Limitações

O desempenho do ensaio Xpert MRSA/SA SSTI foi validado utilizando apenas os procedimentos fornecidos neste folheto. Qualquer modificação destes procedimentos pode alterar o desempenho do teste. Os resultados do ensaio Xpert MRSA/SA SSTI devem ser interpretados em conjunto com outros dados laboratoriais e clínicos à disposição do médico.

O ensaio Xpert MRSA/SA SSTI pode detectar ADN de MRSA e/ou SA a partir de organismos não viáveis. A probabilidade de isto ocorrer aumenta em pacientes que estejam a tomar antibióticos. No estudo clínico central, a taxa de resultados falsos positivos (relativamente à cultura) de detecção de SA em pacientes que utilizaram antibióticos durante as 3 semanas anteriores à realização do teste Xpert MRSA/SA, foi de 13,8 %. A taxa de resultados falsos positivos (relativamente à cultura) de detecção de MRSA em pacientes que utilizaram antibióticos durante as 3 semanas anteriores à realização do teste Xpert MRSA/SA, foi de 9,5 %.

Um teste positivo não indica necessariamente a presença de organismos viáveis. Indica, no entanto, a presença presumível de MRSA ou SA.

Os testes com o ensaio Xpert MRSA/SA SSTI devem ser utilizados como auxiliares de outros métodos disponíveis.

Podem ocorrer resultados de teste errados devido a colheita de amostra incorrecta, incumprimento dos procedimentos recomendados para colheita, manuseamento e conservação da amostra, erro técnico, troca de amostras ou porque o número de organismos na amostra está abaixo do limite de detecção do teste. O cumprimento cuidadoso das instruções deste folheto é necessário para evitar resultados errados.

Como a detecção de MRSA e SA depende do número de organismos presentes na amostra, os resultados fidedignos dependem da correcta colheita, manuseamento e conservação da amostra.

Mutações ou polimorfismos nas zonas de ligação do primer ou da sonda podem afectar a detecção de variantes de MRSA novas ou desconhecidas, resultando num resultado falso negativo.

Em amostras que contenham tanto MRSA como SA, o ensaio Xpert MRSA/SA SSTI pode não detectar os organismos SA resistentes à meticilina (No ensaio clínico central, o ensaio Xpert MRSA/SA SSTI não detectou 2 das 5 amostras de cultura positiva de MRSA, em situações em que existiam infecções mistas de MRSA/SA documentadas).

Numa cultura mista, o limite de detecção (LoD) analítico do MRSA é variável quando estão presentes concentrações extremamente elevadas de SA. Foi observada competição por parte de SA num rácio MRSA:SA de $1{:}1x10^6$. Nos estudos clínicos, 5 das 246 culturas positivas de MRSA apresentavam infecções mistas de MRSA e SA. O Xpert MRSA/SA SSTI identificou 3 das 5 infecções mistas como MRSA positivo e 2 das 5 infecções como SA positivo/MRSA negativo.

Foi observada inibição do ensaio MRSA/SA SSTI com as substâncias seguintes: StaphA $^+$Septic (5 % p/v), hidrocortisona (5 % p/v) e desinfectante antibacteriano para as mãos (5 % p/v).

Não podem ser utilizadas amostras contendo mercurocromo devido à natureza fluorescente do mesmo.

O ensaio Xpert MRSA/SA SSTI produzirá um resultado falso positivo para MRSA quando se testa uma amostra de infecção SSTI mista que contenha *Staphylococcus* coagulase negativo resistentes à meticilina (MRCNS) e *Staphylococcus aureus* de cassete vazia sensíveis à meticilina (SA).

Substâncias interferentes

No estudo de investigação do ensaio Xpert MRSA/SA SSTI, 428 das 848 amostras continham sangue e 404 amostras continham outras substâncias não específicas, as quais poderiam, eventualmente, interferir com o ensaio (note que algumas das amostras continham mais do que um tipo de contaminantes potenciais). Testes exactos de Fisher, realizados com base nos dados obtidos a partir de zaragatoas com e sem estas potenciais substâncias interferentes, demonstraram que a presença das mesmas não afectava o desempenho do ensaio.

Num estudo não clínico, substâncias potencialmente interferentes que poderão estar presentes em amostras de infecção da pele e tecidos moles, foram avaliadas directamente em relação ao desempenho do ensaio Xpert MRSA/SA SSTI. As substâncias potencialmente interferentes, que poderão estar presentes na pele e tecidos moles, podem incluir, entre outras: sangue, pus, plasma, pomadas tópicas (antibióticas/antissépticas/analgésicas), agentes de desbridamento e tinturas. Estas substâncias são referidas nas Tabelas 1 e 2, estando indicados os ingredientes activos e as concentrações testadas. Foi observada inibição do ensaio MRSA/SA SSTI com as substâncias seguintes: StaphA $^{+}$Septic (5 % p/v), hidrocortisona (5 % p/v) e desinfectante antibacteriano para as mãos (5 % p/v).

Não podem ser utilizadas amostras contendo mercurocromo devido à natureza fluorescente do mesmo.

Tabela 1. Substâncias potencialmente interferentes com as SSTI testadas

Substância	Ingrediente activo	% testada
Tampão TET (controlo)	Controlo	Controlo
Camada leucoplaquetária (substituto de ferida)	Leucócitos (1,5e9/ml)	50 % (v/v)
Sangue total (isento de MRSA/SA)	Não aplicável	50 % (v/v)
Plasma	Não aplicável	50 % (v/v)
Neosporina	400 unidades de bacitracina 5000 unidades de polimixina B 3,5 mg de neomicina	1 % e 5 % (p/v)
StaphA^{+}Septic	Cloreto de benzetónio a 0,2 %, lidocaína HCl a 2,5 %	1 % e 5 % (p/v)
Hidrocortisona	Hidrocortisona a 1 %	1 % e 5 % (p/v)
Pomada para alívio cutâneo	Benzocaína a 20 %	1 % e 5 % (p/v)
Tintura de iodo	Iodo a 2 %	50 % (v/v)

Tabela 2. Substâncias potencialmente interferentes com as SSTI testadas

Substância	Ingrediente activo	% testada
Tampão TET (controlo)	Controlo	Controlo
Mupirocina	Cloreto de benzetónio a 0,2 %, lidocaína HCl a 2,5 %	5 % (p/v)
Sangue total (isento de MRSA/SA)	Não aplicável	50 % (v/v)
Solução salina	Cloreto de sódio a 0,65 %	50 % (v/v)
Desinfectante antibacteriano para as mãos	Álcool etílico a 62 %	1 % e 5 % (p/v)
Álcool isopropílico a 70 %	Álcool isopropílico a 70 %	50 % (v/v)

Valores esperados

No estudo clínico do Xpert MRSA/SA SSTI foi incluído um total de 848 amostras de SSTI, obtidas em quatro hospitais de grandes dimensões nos EUA. O número e percentagem de casos positivos, obtidos através do método de cultura de referência, calculados por grupos etários, são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Prevalência observada de MRSA e SA por cultura

Grupo etário	Nº total	MRSA por cultura		SA por cultura	
		Número positivo	Prevalência observada	Número positivo	Prevalência observada
Idade inferior a 3 anos	34	11	32,4 %	21	61,8 %
Idade entre os 3 e os 18 anos	100	25	25,0 %	55	55,0 %
Idade entre os 19 e os 65 anos	614	188	30,6 %	300	48,9 %
Idade igual ou superior a 66 anos	100	22	22,0 %	35	35,0 %

Características de desempenho

Desempenho clínico

As características de desempenho do ensaio Xpert MRSA/SA SSTI foram determinadas num estudo de investigação prospectivo multicêntrico, realizado em quatro instituições dos EUA, que comparou o ensaio Xpert MRSA/SA SSTI com a cultura de referência. Os participantes incluíam indivíduos cujos cuidados de saúde de rotina implicavam a recolha de uma zaragatoa da infecção da pele e tecidos moles do paciente para cultura.

Foram colhidas zaragatoas duplas de cada participante. Uma zaragatoa foi testada pelo ensaio Xpert MRSA/SA SSTI na instituição de inscrição do paciente, a outra zaragatoa foi testada através do método padrão da instituição, sendo a amostra restante enviada para o laboratório central, para ensaios da cultura de referência.

No laboratório central, a amostra foi enriquecida durante a noite em caldo tripticase-soja com 6,5 % de NaCl. O caldo de tripticase-soja foi, seguidamente, semeado em placas com cefoxitina (para MRSA) e sem cefoxitina (para SA). Se alguma, ou ambas as placas de SA ou MRSA, revelassem a presença presumível de colónias de *S. aureus*, as colónias eram subcultivadas numa placa de gelose de sangue. A confirmação de colónias presumivelmente positivas foi realizada com catalase, coagulase em tubo e coloração Gram. A resistência à oxacilina mediada por *MecA* foi testada através de um teste de difusão em disco, utilizando um disco de 30 µg de cefoxitina e um valor limite (cutoff) de 21/22 mm. No caso de ambas as culturas das placas de SA e MRSA serem consideradas negativas, o caldo de tripticase-soja arquivado, com 6,5 % NaCl, era subcultivado em gelose de sangue, seguindo-se o exame de SA/MRSA, conforme anteriormente descrito.

O desempenho do ensaio Xpert MRSA/SA SSTI foi calculado em relação aos resultados da cultura de referência.

Resultados totais

Para determinação de MRSA e SA foi testado um total de 848 amostras através do ensaio Xpert MRSA/SA SSTI e de cultura.

Entre os 848 casos contidos no conjunto de dados elegível, a utilização de antibióticos nas 3 semanas anteriores à recolha das amostras foi reportada em 207 participantes, sendo confirmada a não utilização de antibióticos em 441 participantes; em 200 dos casos, desconhecia-se se tinham sido utilizados antibióticos anteriormente ou não. Foi observada uma diminuição estatisticamente significativa, em termos de taxa de resultados positivos de SA, comparativamente com os resultados obtidos com a cultura, nos casos em que tinham sido utilizados antibióticos (p = 0,007); este fenómeno também se encontra descrito na literatura.[10, 11, 12, 13, 14] A taxa de resultados positivos de MRSA para a cultura também diminuiu, embora em menor grau (p = 0,022). Não foi observada uma diminuição da taxa de resultados positivos com o ensaio Xpert MRSA/SA SSTI, nos casos em que tinham sido utilizados antibióticos, nem foi observada qualquer inibição no ensaio na presença de antibióticos tópicos (consulte Substâncias Interferentes). A diminuição das taxas de culturas positivas para MRSA e SA na presença de antibióticos causou um valor mais elevado do que o esperado, em termos de taxas de resultados falsos positivos, observado com o ensaio Xpert MRSA/SA SSTI.

Cinco (5) das 246 culturas positivas para MRSA apresentavam infecções mistas de MRSA e SA. O Xpert MRSA/SA SSTI identificou 3 das 5 infecções mistas como MRSA positivo e 2 das 5 infecções como SA positivo/MRSA negativo.

O desempenho do ensaio Xpert MRSA/SA SSTI é resumido nas tabelas 4 a 6.

Tabela 4. Desempenho MRSA/SA em participantes sem utilização de antibióticos (nas 3 semanas anteriores à recolha) vs. cultura de referência

		Cultura			
		MRSA+	**SA+/MRSA-**	**Neg/Sem crescimento**	**Total**
Xpert	MRSA+	137[a]	2	6	145
	SA+/MRSA-	3[b]	79	16	98
	SA-	6	4	188	198
	Total	146	85	210	441

[a] 1 das 137 apresentava uma infecção mista por MRSA e SA.
[b] 2 das 3 apresentavam infecções mistas por MRSA e SA.

Concordância de percentagem positiva (MRSA+) = 93,8; intervalo de confiança de 95 % = 88,6 – 97,1

Concordância de percentagem negativa (MRSA+) = 97,3; intervalo de confiança de 95 % = 94,7 – 98,8

Concordância de percentagem positiva (SA+/MRSA+) = 95,7; intervalo de confiança de 95 % = 92,2 – 97,9

Concordância de percentagem negativa (SA+/MRSA+) = 89,5; intervalo de confiança de 95 % = 84,6 – 93,3

Entre os participantes que não tinham utilizado antibióticos nas 3 semanas anteriores à recolha de amostras, o ensaio Xpert MRSA/SA SSTI identificou 93,8 % das amostras positivas para MRSA e 97,3 % das amostras negativas para MRSA, relativamente ao método de cultura de referência, e 95,7 % das amostras positivas para SA e 89,5 % das amostras negativas para SA, relativamente ao método de cultura de referência.

Entre estes participantes que não tinham utilizado antibióticos, 96,8 % (427/441) obtiveram um resultado válido na primeira tentativa do ensaio Xpert MRSA/SA SSTI. Os restantes 14 apresentaram resultados indeterminados na primeira tentativa (6 "INVÁLIDO", 7 "ERRO" e 1 "SEM RESULTADO"). Dos 14 participantes que apresentaram resultados indeterminados na primeira tentativa, todos apresentaram um resultado na segunda tentativa.

Tabela 5. Desempenho MRSA/SA em participantes com utilização de antibióticos desconhecida (nas 3 semanas anteriores à recolha) vs. cultura de referência

		Cultura			
		MRSA+	**SA+/MRSA-**	**Neg/Sem crescimento**	**Total**
Xpert	MRSA+	47[c]	0	4	51
	SA+/MRSA-	2	45	8	55
	SA-	1	2	91	94
	Total	50	47	103	200

[c] 2 das 47 apresentavam infecções mistas por MRSA e SA.

Concordância de percentagem positiva (MRSA+) = 94,0; intervalo de confiança de 95 % = 83,5 – 98,7

Concordância de percentagem negativa (MRSA+) = 97,3; intervalo de confiança de 95 % = 93,3 – 99,3

Concordância de percentagem positiva (SA+/MRSA+) = 96,9; intervalo de confiança de 95 % = 91,2 – 99,4

Concordância de percentagem negativa (SA+/MRSA+) = 88,3; intervalo de confiança de 95 % = 80,5 – 93,8

Nos casos em que se desconhecia se os participantes tinham ou não utilizado antibióticos nas 3 semanas anteriores à recolha de amostras, o ensaio Xpert MRSA/SA SSTI identificou 94,0 % das amostras positivas para MRSA e 97,3 % das amostras negativas para MRSA, relativamente ao método de cultura de referência, e 96,9 % das amostras positivas para SA e 88,3 % das amostras negativas para SA, relativamente ao método de cultura de referência.

Entre estes participantes com utilização de antibióticos desconhecida, 97,0 % (194/200) obtiveram um resultado válido na primeira tentativa do ensaio Xpert MRSA/SA SSTI. Os restantes 6 apresentaram resultados indeterminados na primeira tentativa (2 "INVÁLIDO", 3 "ERRO" e 1 "SEM RESULTADO"). Dos 6 participantes que apresentaram resultados indeterminados na primeira tentativa, todos apresentaram um resultado na segunda tentativa.

Tabela 6. Desempenho MRSA/SA em participantes com utilização de antibióticos confirmada (nas 3 semanas anteriores à recolha) vs. cultura de referência

		Cultura			
		MRSA+	**SA+/MRSA-**	**Neg/Sem crescimento**	**Total**
Xpert	MRSA+	44	2	10	56
	SA+/MRSA-	3	31	19	53
	SA-	3	1	94	98
	Total	50	34	123	207

Concordância de percentagem positiva (MRSA+) = 88,0; intervalo de confiança de 95 % = 75,7 – 95,5

Concordância de percentagem negativa (MRSA+) = 92,4; intervalo de confiança de 95 % = 87,0 – 96,0

Concordância de percentagem positiva (SA+/MRSA+) = 95,2; intervalo de confiança de 95 % = 88,3 – 98,7

Concordância de percentagem negativa (SA+/MRSA+) = 76,4; intervalo de confiança de 95 % = 67,9 – 83,6

Entre os participantes que tinham utilizado antibióticos nas 3 semanas anteriores à recolha de amostras, o ensaio Xpert MRSA/SA SSTI identificou 88,0 % das amostras positivas para MRSA e 92,4 % das amostras negativas para MRSA, relativamente ao método de cultura de referência, e 95,2 % das amostras positivas para SA e 76,4 % das amostras negativas para SA, relativamente ao método de cultura de referência.

Entre estes participantes com utilização de antibióticos confirmada, 96,1 % (199/207) das amostras elegíveis obtiveram um resultado válido na primeira tentativa do ensaio Xpert MRSA/SA SSTI. As restantes 8 apresentaram resultados indeterminados na primeira tentativa (5 "INVÁLIDO" e 3 "ERRO"). Dos 8 participantes que apresentaram resultados indeterminados na primeira tentativa, todos apresentaram um resultado na segunda tentativa.

Variantes de cassete vazia

Para que um isolado seja identificado como positivo para MRSA com o ensaio Xpert MRSA/SA SSTI, o teste de *spa* tem de ser positivo, bem como o teste de *mecA* e SCC*mec*. Um isolado que apresente um resultado positivo para *spa* e SCC*mec*, mas não para *mecA* é reportado como SA, porque é sensível à meticilina. Esta situação pode ocorrer quando a porção do elemento SCC*mec* que transporta *mecA* é excisada, mas as extremidades deste elemento móvel permanecem no lugar, originando um sinal SCC*mec* positivo. Estes isolados são, por vezes, referidos como "variantes de cassete vazia", não sendo invulgares no ambiente clínico. A importância destes isolados reside no facto dos mesmos poderem, potencialmente, confundir um ensaio de determinação de MRSA que não detecte o gene *mecA* directamente. O ensaio Xpert MRSA/SA SSTI foi concebido para identificar correctamente estas variantes como SA.

Entre as amostras elegíveis incluídas nas análises de dados apresentadas neste relatório, um total de 16 isolados correspondem ao perfil de cassete vazia, originando resultados de testes de *spa* e SCC*mec* positivos, mas sem detecção de *mecA* (Ct = 0), conforme se mostra na Tabela 7. Verificou-se que quinze (15) das 16 amostras eram isolados verdadeiros negativos (VN) em termos de MRSA, relativamente à cultura, e 14 das 16 amostras foram identificadas como isolados verdadeiros positivos (VP) em termos de SA, relativamente à cultura. Um isolado foi identificado como MRSA pela cultura e 2 isolados foram identificados pela cultura como sendo negativos em termos de MRSA e SA.

Tabela 7. Desempenho MRSA/SA SSTI vs. cultura de referência — Variantes de cassete vazia

Nº do participante	Xpert Resultado	*spa* (Ct)	*mecA* (Ct)	SCC*mec* (Ct)	Cultura	Xpert vs. cultura	
						MRSA	SA
1	SA	23,6	0	26,0	SA	VN	VP
2	SA	14,7	0	16,5	SA	VN	VP
3	SA	20,5	0	34,0	SA	VN	VP
4	SA	18,4	0	21,0	SA	VN	VP
5	SA	15,6	0	28,4	MRSA	FN	VP
6	SA	17,2	0	31,6	SA	VN	VP
7	SA	34,1	0	35,6	Neg.	VN	FP
8	SA	29,1	0	33,0	SA	VN	VP
9	SA	12,7	0	23,5	SA	VN	VP
10	SA	18,2	0	27,6	SA	VN	VP
11	SA	18,4	0	22,0	SA	VN	VP
12	SA	25,5	0	27,7	SA	VN	VP
13	SA	20,0	0	22,1	Neg.	VN	FP
14	SA	26,0	0	28,3	SA	VN	VP
15	SA	23,9	0	25,7	SA	VN	VP
16	SA	19,9	0	34,0	SA	VN	VP

Desempenho analítico

Especificidade analítica

Estudo de reactividade cruzada

Cento e cinco (105) estirpes foram colhidas, quantificadas e testadas, utilizando o ensaio Xpert MRSA/SA SSTI. As 98 culturas obtidas da American Type Culture Collection (ATCC) e as 7 estirpes obtidas da Network on Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* (NARSA), representam espécies filogeneticamente relacionadas com o *Staphylococcus aureus* ou com estafilococos potencialmente existentes num ambiente hospitalar.

Destes, foram incluídos os estafilococos coagulase negativos sensíveis à meticilina (29) e os estafilococos coagulase negativos resistentes à meticilina (9). Os organismos testados foram identificados como Gram-positivo (74), Gram-negativo (28) ou levedura (3). Os organismos foram também classificados como aeróbicos (95) ou anaeróbicos (10).

Duas (2) ou mais réplicas de cada isolado foram testadas a 1,7-3,2 unidades de McFarland. Sob as condições do estudo, todos os isolados foram indicados como negativos para MRSA e SA; nenhum dos isolados foi detectado pelo ensaio Xpert MRSA/SA SSTI. Foram incluídos no estudo controlos Positivos e Negativos. A especificidade analítica foi de 100 %.

Avaliação de estirpes BORSA

Foram testadas sete (7) estirpes bem caracterizadas de *Staphylococcus aureus* com baixo nível de resistência à oxacilina (BORSA, do inglês borderline oxacillin-resistant Staphylococcus aureus), incluindo uma de "cassete vazia" aparente (consultar acima). O *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina é resistente a todos os fármacos beta-lactâmicos por via da proteína alternativa de ligação à penicilina PBP2a, codificada pelo *mecA*[15]. As estirpes BORSA são negativas em termos de *mecA*, mas exibem uma concentração inibitória mínima (CIM) de oxacilina ≥ 2 e ≤ 8 µg/ml. É especialmente importante distinguir os MRSA dos BORSA, para impedir a utilização desnecessária e inadequada de vancomicina e a implementação de precauções de isolamento não justificadas para pacientes infectados com uma estirpe sensível aos beta-lactâmicos[16].

Sob as condições deste estudo, todos os 7 isolados BORSA (incluindo o isolado de "cassete vazia" aparente) foram indicados como negativos para MRSA e positivos para SA, tanto em altas como em baixas concentrações celulares, utilizando o ensaio Xpert MRSA/SA SSTI. Não foram registados sinais de *mecA*. Estes resultados demonstraram que, utilizando o ensaio Xpert MRSA/SA SSTI, uma estirpe BORSA será correctamente identificada como MRSA negativa/SA positiva e não reportará um teste falso positivo em termos de MRSA.

Sensibilidade analítica

Estudos sobre o limite de detecção

Foram realizados estudos para determinar os intervalos de confiança de 95 % para o limite de detecção analítico (LoD) de células de *Staphylococcus aureus* (SA) e de células de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), diluídas numa matriz de substituto de ferida de origem humana. A matriz de substituto de ferida consistia num concentrado de glóbulos brancos, preparado a partir de sangue total por centrifugação. A matriz também continha glóbulos vermelhos e plasma, bem como uma quantidade insignificante de anticoagulante (CPD ou CPDA-1). O limite de detecção é definido como o menor número de unidades formadoras de colónias (UFC) por amostra que pode ser distinguido com reprodutibilidade das amostras negativas com 95 % de confiança, ou a concentração mais baixa na qual 19 ou 20 réplicas são positivas.

Em termos de MRSA, foram avaliadas réplicas de 20 em cada concentração testada de MRSA (UFC/zaragatoa), para 6 isolados individuais representando SCC*mec* dos tipos I, II, III, IVa, V e VI. Quando caracterizadas através de electroforese em gel de campo pulsado (PFGE, do inglês pulsed-field gel electrophoresis), a USA100, a estirpe adquirida com maior frequência nas unidades de cuidados de saúde, bem como a USA400, uma das estirpes adquiridas com maior frequência na comunidade, estavam representadas.

Em termos de SA, foram avaliadas réplicas de 20 em cada concentração de SA (UFC/zaragatoa), para 3 isolados individuais de SA. As estirpes dos tipos USA900 e USA1200 estavam representadas.

Os intervalos de estimativa e confiança foram determinados utilizando regressão logística com dados (número de resultados positivos por número de réplicas, em cada nível), ao longo do intervalo de UFC/zaragatoa testado. Os intervalos de confiança foram determinados utilizando estimativas de máxima probabilidade sobre os parâmetros do modelo logístico, utilizando a grande matriz de variância-covariância da amostra. As estimativas do ponto de LoD e os intervalos de confiança de 95% superiores e inferiores para cada tipo de SCC*mec* de SA e MRSA testado, são resumidos nas tabelas 8 e 9.

Tabela 8. Intervalos de confiança de 95 % para o LoD analítico – SA

Identificação da estirpe de SA	PFGE	LoD (UFC/zaragatoa)	IC de 95 % inferior	IC de 95 % superior
N7129	USA900	51	42	69
102-04	USA1200	87	76	109
29213	desconhecida	123	97	188

Tabela 9. Intervalos de confiança de 95 % para o LoD analítico – MRSA

Identificação da estirpe de MRSA	Tipo SCC*mec*	PFGE	LoD (UFC/zaragatoa)	IC de 95 % inferior	IC de 95 % superior
64/4176	I	USA500	221	195	271
N315	II	USA100	122	106	152
11373	III	desconhecida	124	115	155
MW2	IVa	USA400	82	68	113
ST59-MRSA-V	V	USA1000	242	208	305
HDE288	VI	USA800	183	161	223

Os resultados deste estudo indicam que o ensaio Xpert MRSA/SA SSTI produzirá um resultado positivo em termos de SA em 95 % das vezes, com uma confiança de 95 % para uma zaragatoa de ferida contendo 150 UFC, e um resultado positivo em termos de MRSA em 95 % das vezes, com uma confiança de 95 % para uma zaragatoa de ferida contendo 300 UFC.

Foram testadas cento e vinte e uma (121) estirpes adicionais de *Staphylococcus aureus*, utilizando o ensaio Xpert MRSA/SA SSTI. Foram desenvolvidas culturas durante a noite em meio BHI (Brain Heart Infusion), sendo ajustadas a 0,5 unidades de McFarland. Todas as estirpes foram testadas em triplicado utilizando 100 µl de culturas adicionalmente diluídas cem mil a um milhão de vezes.

Foram seleccionadas estirpes de MRSA (78) e SA (43) para representar de forma alargada a gama de diversidade genética encontrada na espécie *Staphylococcus aureus*, com base na estrutura filogenética. As selecções representavam linhagens principais, com ênfase em

complexos clonais específicos nos quais o MRSA é predominantemente observado. Foram incluídas estirpes contendo MRSA e SA, assim como as que continham exclusivamente SA.

O ensaio Xpert MRSA/SA SSTI identificou correctamente 116 das 121 estirpes. As 5 discordantes foram caracterizadas através de catalase, coagulase em tubo e coloração Gram. A resistência à oxacilina mediada por*MecA* foi avaliada através de difusão em disco, utilizando um disco de 30 µg de cefoxitina e um limite de diâmetro de 21/22 mm.

Três (3) das 78 estirpes de MRSA foram reportadas como sendo negativas para MRSA/positivas para SA, utilizando o ensaio Xpert MRSA/SA SSTI. A caracterização adicional indica que estas estirpes não são resistentes e foram correctamente reportadas como negativas para MRSA e positivas para SA.

Duas (2) das 43 estirpes de SA foram reportadas como sendo positivas para MRSA/positivas para SA, utilizando o ensaio Xpert MRSA/SA SSTI. A caracterização adicional indica que estas estirpes são resistentes e foram correctamente reportadas como positivas para MRSA/positivas para SA.

Cada um dos 12 isolados que se sabia conterem USA300 foi correctamente reportado como sendo positivo para MRSA e positivo para SA, conforme previsto.

Avaliação de variantes de cassete vazia

Foram testados vinte e dois (22) isolados de *Staphylococcus aureus* identificados como "variantes de cassete vazia", utilizando o ensaio Xpert MRSA/SA SSTI. As culturas durante a noite foram ajustadas para 0,5 unidades de McFarland. Todas as estirpes foram testadas a partir de culturas adicionalmente diluídas 100 vezes (elevado) e 100 000 vezes (baixo).

O ensaio Xpert MRSA/SA SSTI identificou correctamente todos os 22 isolados como sendo negativos para MRSA e positivos para SA. Em ambas as concentrações de células testadas, apenas foram reportados os Ct para os alvos *spa* e SCC*mec*. Não foram registados Ct de *mecA*.

Estudo de contaminação por "carry-over"

Foi realizado um estudo para demonstrar que os cartuchos GeneXpert de utilização única e autónomos impedem a contaminação por "carry-over" durante o ensaio de amostras negativas após a presença de amostras altamente positivas no mesmo módulo GeneXpert. O estudo consistiu no processamento de uma amostra negativa no mesmo módulo GeneXpert imediatamente após o processamento de uma amostra altamente positiva para MRSA (aproximadamente 10^7 UFC/teste). Este procedimento foi repetido 20 vezes entre 2 módulos GeneXpert, num total de 42 testes. Não se verificaram evidências de contaminação por "carry-over". Todas as 21 amostras positivas foram correctamente reportadas como sendo positivas para MRSA/positivas para SA. Todas as 21 amostras negativas foram correctamente reportadas como sendo negativas para MRSA/negativas para SA.

Reprodutibilidade

Um painel de 10 amostras com concentrações variáveis de SA, MRSA e *Staphylococcus epidermidis* (negativo), foi testado em duplicado em 10 dias diferentes, em cada um dos três locais (10 amostras × 2 vezes/dia × 10 dias × 3 locais). Foi utilizado um lote do kit Xpert MRSA/SA em cada um dos 3 locais de teste. Os ensaios Xpert MRSA/SA foram realizados de acordo com o procedimento do ensaio Xpert MRSA/SA SSTI.

Tabela 10. Resumo dos resultados da reprodutibilidade

ID da amostra	Local 1	Local 2	Local 3	Concordância total
Neg (MSSE)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (60/60)
Neg. forte p/ SA	100 % (20/20)	100 % (20/20)	90 % (18/20)	96,7 % (58/60)
Pos. fraco p/ SA	100 % (20/20)	100 % (20/20)	95 % (19/20)	98,3 % (59/60)
Neg. forte p/ MRSA1	100 % (20/20)	90 % (18/20)	100 % (20/20)	96,6 % (58/60)
Pos. fraco p/ MRSA1	100% (20/20)	100% (20/20)	90% (18/20)	96.6% (58/60)
Neg. forte p/ MRSA2	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Pos. fraco p/ MRSA2	100% (20/20)	95% (19/20)	95% (19/20)	96.6% (58/60)
% de concordância total por local	100% (140/140)	97.9% (137/140)	95.7% (134/140)	97.9% (411/420)

Tabela 11. Resumo dos resultados de valor de Ct por nível de amostra e sonda

SPC			
Nível	**Média**	**Desv. padrão**	**%CV**
Neg. forte p/ MRSA1	34,52	0,82	2,36
Neg. forte p/ MRSA2	34,46	0,85	2,46
Neg (MSSE)	34,44	0,90	2,62
Neg. forte p/ SA	34,38	0,92	2,66
Spa			
Nível	**Média**	**Desv. padrão**	**%CV**
Pos. fraco p/ MRSA1	32,96	0,8	2,44
Pos. fraco p/ MRSA2	31,05	0,69	2,21
Pos. fraco p/ SA	33,91	0,8	2,35
mecA			
Nível	**Média**	**Desv. padrão**	**%CV**
Pos. fraco p/ MRSA1	33,25	0,80	2,40
Pos. fraco p/ MRSA2	31,50	0,68	2,16
SCC*mec*			
Nível	**Média**	**Desv. padrão**	**%CV**
Pos. fraco p/ MRSA1	34,19	0,90	2,63
Pos. fraco p/ MRSA2	33,13	0,68	2,05

Foi realizado um segundo estudo de reprodutibilidade, utilizando um painel de 4 amostras de (SA: 10X LoD, MRSA1: 10X LoD, MRSA2: 10X LoD e controlo negativo: *Staphylococcus epidermidis*). Os painéis foram testados em duplicado em 10 dias diferentes, em cada um dos três locais (4 amostras × 2 vezes/dia × 10 dias × 3 locais). Foi utilizado um lote do kit Xpert MRSA/SA SSTI em cada um dos 3 locais de teste. Os ensaios Xpert MRSA/SA SSTI foram realizados de acordo com o procedimento do ensaio Xpert MRSA/SA SSTI. Os resultados correctos foram obtidos em 239 dos 240 testes.

Tabela 12. Resumo dos resultados da reprodutibilidade

ID da amostra	Local 1	Local 2	Local 3	Concordância total
Neg (MSSE)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (60/60)
Pos. moderado p/ SA[1]	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (60/60)
Pos. moderado p/ MRSA1[1]	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (20/20)	100 % (60/60)
Pos. moderado p/ MRSA2[1]	100 % (20/20)	100 % (20/20)	95 % (19/20)	98,3 % (59/60)
% de concordância total por local	100 % (80/80)	100 % (80/80)	98,8 % (79/80)	99,6 % (239/240)

[1] 10X LoD

Tabela 13. Resumo dos resultados de valor de Ct por nível de amostra e sonda

SPC			
Nível	**Média**	**Desv. padrão**	**%CV**
Pos. moderado p/ MRSA1	35,72	1,87	5,24
Pos. moderado p/ MRSA2	36,29	2,66	7,34
Pos. moderado p/ SA	34,55	1,19	3,44
NEG.	34,45	1,06	3,09
Spa			
Nível	**Média**	**Desv. padrão**	**%CV**
Pos. moderado p/ MRSA1	29,52	1,30	4,40
Pos. moderado p/ MRSA2	28,91	1,03	3,57
Pos. moderado p/ SA	30,59	0,91	2,99
mecA			
Nível	**Média**	**Desv. padrão**	**%CV**
Pos. moderado p/ MRSA1	29,78	1,28	4,29
Pos. moderado p/ MRSA2	29,32	1,24	4,22
SCC*mec*			
Nível	**Média**	**Desv. padrão**	**%CV**
Pos. moderado p/ MRSA1	31,49	1,26	3,99
Pos. moderado p/ MRSA2	31,05	1,12	3,59

Referências

1. Bannerman TL. 2003 Capítulo 28: Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci that Grow Aerobically. Manual of clinical microbiology, 8th ed. ASM Press Washington, DC. Páginas 384-404.
2. Mainous AG, Hueston WJ, Everett, et al. 2006. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *S aureus* in the United States, 2001-2002. An Family Medicine. 4(2):132-137.
3. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. Am J Infect Control 2004;32:470-85.
4. Chaix C, Durand-Zileski I, Alberti C, Buisson B. 1999. Control of Endemic Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. JAMA 282(19):1745-51.
5. Shopsin B, Kreiswirth BN. 2001. Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Emerging Infectious Diseases 7(2) 323-6.
6. Salgado CD et al. 2003. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Meta-analysis of Prevalence and Risk Factors. CID 36:131.
7. Donnio, P-Y, Février F, Bifani P, et al. 2007. Molecular and epidemiological evidence for the spread of multiresistant methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains in hospitals. Antimicrobial. Agents Chemother. 51: 4342 – 4350.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). HHS Publication number (CDC) 93-8395.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (refere-se à edição mais recente).
10. Ewig S, Schlochtermeier M, Göke N, et al. 2002. Applying sputum as a diagnostic tool in pneumonia: limited yield, minimal impact on treatment decisions. Chest. 121:1486-1492.
11. RG Dotson and SK Pingleton. 1993. The effect of antibiotic therapy on recovery of intracellular bacteria from bronchoalveolar lavage in suspected ventilator-associated nosocomial pneumonia. Chest. 103, 541-546.
12. Souweine B, Veber B, Bedos JP, et al. 1998. Diagnostic accuracy of protected specimen brush and bronchoalveolar lavage in nosocomial pneumonia: impact of previous antimicrobial treatments. Crit Care Med. Feb;26(2):236-244.
13. Kanegaye JT, Soliemanzadeh P, Bradley JS, et al. 2001. Lumbar puncture in pediatric bacterial meningitis: defining the time interval for recovery of cerebrospinal fluid pathogens after parenteral antibiotic pretreatment. Pediatrics. 108(5):1169-1174.
14. Brook I, Gober A. 2005. Effects of amoxicillin and cefdinir on nasopharyngeal bacterial flora. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. Sep;131:785-787.
15. Nadarajah J, et. al., Identification of different clonal complexes and diverse amino acid substitutions in penicillin-binding protein 2 (PBP2) associated with borderline oxacillin resistance in Canadian *Staphylococcus aureus* isolates. J of Med Micro (2006), 55: 1675-1683.
16. Ribeiro J, et. al., Misclassification of Susceptible Strains of *Staphylococcus aureus* as Methicillin-Resistant *S. aureus* by a rapid Automated Susceptibility Testing System. (1999), 37: 1619-1620.

Assistência

Para obter assistência, contacte a Cepheid através de uma das seguintes informações de contacto. No seu contacto telefónico ou quando enviar uma mensagem de e-mail, certifique-se de que indica o número de série do instrumento e a ID do lote de reagente.

União Europeia

Para obter apoio técnico, utilize as seguintes informações de contacto:

Telefone: +33.563.82.53.19

E-mail: techsupport@cepheideurope.fr

Outras localizações

Contacte o representante Cepheid local.

Tabela de símbolos

Símbolo	Significado
REF	Referência
IVD	Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*
	Não reutilizar
LOT	Código do lote
	Atenção, consultar os documentos anexos
	Fabricante
	Conteúdo suficiente para <n> testes
	Prazo de validade
CONTROL	Controlo
EC REP	Representante autorizado na Comunidade Europeia
CE	Marcação CE – Conformidade Europeia
	Limites de temperatura
	Riscos biológicos

Cepheid AB
Röntgenvägen 5
SE-171 54 Solna
Suécia

Produto da Suécia

EC REP

Cepheid Europe
Vira Solelh
81470 Maurens-Scopont
França

Telefone: +33.563.82.53.00
Fax: +33.563.82.53.01
E-mail: cepheid@cepheideurope.fr

CE IVD